



UNIVERSITA' DI NAPOLI FEDERICO II



DOTTORATO IN
BIOCHIMICA E BIOLOGIA CELLULARE
E MOLECOLARE

TESI DI DOTTORATO 2007

RUOLO DI NRF2 E p53 NELLA REGOLAZIONE DI
GENI COINVOLTI NELLA RESISTENZA ALLO
STRESS OSSIDATIVO

DOTTORANDO:

DOMENICO DI MARZO
DIPARTIMENTO DI
BIOCHIMICA
E BIOTECNOLOGIE MEDICHE
UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI
NAPOLI FEDERICO II

RELATORE:

PROF. FILIBERTO CIMINO

COORDINATORE:

PROF. GIUSEPPE D'ALESSIO

Riassunto	I
Summary	II
1. INTRODUZIONE	
1.1 I ROS nelle funzioni cellulari	1
1.2 Resistenza allo stress ossidativo	5
1.3 Nrf2 e la risposta allo stress ossidativo	7
1.4 p53 nelle funzioni cellulari	9
1.5 p53 come repressore trascrizionale	12
1.6 Scopo della ricerca	17
 2. MATERIALI E METODI	
2.1 Colture cellulari	18
2.2 Estrazione dell'RNA e reazione della trascrittasi inversa	18
2.3 PCR Real-Time quantitativa	19
2.4 Plasmidi e trasfezioni	20
2.5 Preparazione di estratti proteici nucleari e totali per Western blot	21
2.6 Saggi di Immunoprecipitazione della Cromatina (ChIP)	23
2.7 Analisi dell'apoptosi al citofluorimetro (FACS)	25
 3. RISULTATI	
3.1 Cellule resistenti allo stress ossidativo indotto dal DEM iperesprimono geni delle difese antiossidanti correlati ad un livello elevato di Nrf2 nel nucleo	26
3.2 L'iperespressione di p53 interferisce con l'induzione mediata da Nrf2 dei promotori contenenti sequenze ARE	28
3.3 L'attività di p53 indotta da danno al DNA si contrappone alla risposta antiossidante Nrf2-dipendente	30
3.4 p53 sopprime la transattivazione dei geni Nrf2 dipendenti attraverso interazione con il promotore del gene x-CT	37
3.5 Mutazioni di p53 nella regione C-terminale non riducono l'effetto inibitorio di p53 sul promotore del gene x-ct	38
3.6 Il gene NQO1 è regolato da p53 in modo simile al gene x-CT	41
3.7 L'assenza di p53 riduce la sensibilità delle cellule all'apoptosi indotta dal DEM	42
 4. DISCUSSIONE E PROSPETTIVE FUTURE	45
 5. BIBLIOGRAFIA	47

RINGRAZIAMENTI

Alla fine dei quattro anni di dottorato desidero ringraziare le persone con le quali ho avuto il piacere e la fortuna di interagire. In particolare, desidero ringraziare il mio docente guida, il professore Filiberto Cimino, per gli insegnamenti ricevuti.

Desidero ringraziare la professoressa Raffaella Faraonio, alla quale sono profondamente riconoscente per le continue sollecitudini che ha saputo fornire alla mia formazione scientifica e per l'affetto e la disponibilità dimostratami soprattutto nei momenti difficili, con la sua costante attenzione.

Un sincero ringraziamento va al professore Tommaso Russo per i suoi preziosi suggerimenti scientifici e per la disponibilità e l'affetto che mi ha sempre dimostrato.

Un ringraziamento particolare va agli amici di laboratorio: Paola, Barbara, Michele, Nicola V, Nicola M.G., Serena, Francesca, Maria Luigia, Gabriele, la professoressa M.A Bevilacqua, la professoressa F. Esposito e il professore R. Ammendola che con il loro affetto e il loro entusiasmo hanno reso meno pesanti le ore di lavoro in laboratorio.

RIASSUNTO

Le cellule rispondono allo stress ossidativo attivando la trascrizione di geni coinvolti nella risposta antiossidante. L'espressione della maggior parte di questi geni è regolata dal fattore trascrizionale Nrf2. Nostri risultati precedenti mostrano che in cloni resistenti allo stress ossidativo, i livelli di mRNA dei geni del trasportatore cistina/glutammato (x-CT), della glutatione S-trasferasi (GST α 1) e dell'NAD(P)H chinone reduttasi (NQO1) sono aumentati e che tale aumento è correlato ad un incremento dei livelli nucleari della proteina Nrf2.

In parallelo con questa "risposta antiossidante", le cellule attivano meccanismi di riparo dei danni indotti dai ROS. Un ruolo chiave in questa risposta cellulare è svolto dalla proteina p53, che induce arresto del ciclo cellulare per riparare danni al DNA e/o apoptosi in presenza di un danno al DNA non riparabile.

In questa tesi abbiamo esplorato una possibile "comunicazione" tra questi due meccanismi di regolazione. Esperimenti di trasfezione transiente avevano dimostrato che p53 regola negativamente l'induzione dei geni Nrf2-dipendenti. In questo studio abbiamo dimostrato che l'aumento dei trascritti endogeni di questi geni dovuto ad iperespressione di Nrf2 o a trattamento con il DEM, viene contrastato dalla iperespressione di p53 o dalla sua attivazione endogena. Attraverso esperimenti di "Chromatin immunoprecipitation" (ChIP) abbiamo dimostrato che p53 è presente nella regione cromatinica dei promotori dei geni x-CT ed NQO1 e che l' iperespressione di p53 è in grado di inibire il legame di Nrf2 su entrambi i promotori, indicando un meccanismo molecolare di inibizione comune ai geni Nrf2-dipendenti. Inoltre, risultati emersi dalla dissezione del promotore del gene di x-CT indicano che la regione minima coinvolta nell'interazione con p53 contiene anche la TATA box.

SUMMARY

Cells respond to oxidative stress by activating the transcription of genes involved in the anti-oxidant response. The expression of most of these genes is regulated by the transcription factor Nrf2. Our previous data show that in cell clones resistant to oxidative stress mRNA levels of cystine/glutamate transporter (x-CT), of glutathione-S-transferase $\alpha 1$ (GST $\alpha 1$) and of NAD(P)H: quinone oxidoreductase-1 (NQO1) genes are increased and this augment is due to increased nuclear levels of Nrf2 protein.

In parallel with this “antioxidant response”, cells activate repair mechanisms of the ROS-induced damages. A key role in this cellular response is played by p53, which induces cell cycle arrest aimed to repair DNA damages, and/or apoptosis in presence of an unrepairable DNA damage.

In this thesis we explored the possible cross talk between these two regulatory mechanisms. Transient transfection experiments showed that p53 negatively regulates the induction of Nrf2-dependent genes. In this study we have shown that the increase of endogenous transcripts due to Nrf2 overexpression or exposure to DEM is antagonized by p53 overexpression or endogenous p53 activation.

By “Chromatin immunoprecipitation” (ChIP) experiments we have shown that p53 is present in chromatinized region of the x-CT and NQO1 gene promoters and that p53 overexpression can inhibit the Nrf2 binding to both promoters, suggesting a common molecular mechanism of inhibition for Nrf2-dependent genes. Furthermore, results emerged from the dissection of the x-CT gene promoter indicate that the minimal region involved in the interaction with p53 also contains the TATA box.

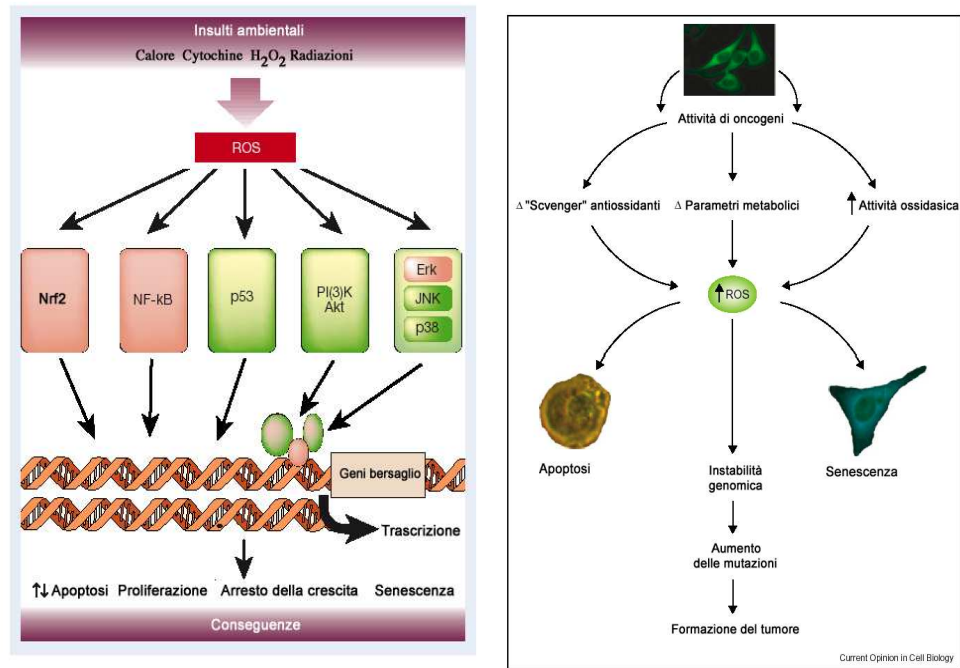
1. INTRODUZIONE

1.1 *I ROS nelle funzioni cellulari*

I principali radicali liberi dell'ossigeno o ROS (Reactive Oxygen Species), composti con elevata reattività chimica, sono: $O_2^{\bullet-}$ (anione superossido), $^{\bullet}O_2H$ (radicale idroperossido); $^{\bullet}OH$ (radicale idrossilico); NO^{\bullet} (monossido d'azoto); $ONOO^-$ (anione perossinitrito). Altre molecole, quali H_2O_2 (perossido d'idrogeno) e $HOCl$ (acido ipocloroso), pur non essendo radicali di per sé, producono facilmente $^{\bullet}OH$ altamente reattivo (1, 2, 3). Nei sistemi biologici, i ROS vengono generati ed eliminati continuamente. Essi vengono prodotti sia attraverso una serie di reazioni catalizzate da enzimi che attraverso reazioni di natura non enzimatica, ma anche in seguito ad esposizione a radiazioni ionizzanti, xenobiotici, agenti chemoterapici (1).

A concentrazioni elevate i ROS danneggiano i maggiori costituenti della cellula (DNA, proteine, lipidi) partecipando così a processi quali l'invecchiamento (4) e le patologie ad esso correlate (5, 6), nonché all'induzione e al mantenimento dello stato trasformato (6 e referenze contenute in essa). A concentrazioni moderate, tuttavia, i ROS partecipano attivamente ad una varietà di processi biologici complessi, quali la trasduzione del segnale, il controllo dell'espressione genica, l'apoptosi, la senescenza cellulare, (7, 8, 9 e Figura 1A).

ROS come molecole segnale intracellulari (secondi messaggeri) sono generati nella trasduzione del segnale mitogenico mediata dal recettore del PDGF (Platelet Derived Growth Factor Receptor) e da altre classi di recettori come



A

B

Figura 1

A. Funzione dei ROS

I ROS possono essere prodotti all'esterno della cellula, o dalla cellula stessa in risposta a stimoli esterni. I fattori di trascrizione Nrf2, p53 e NF-kB sono essi stessi regolati dai ROS, mentre le vie del segnale PI(3)K/Akt e MAPK regolano fattori di trascrizione attraverso la fosforilazione.

Il risultato definitivo dipende dal bilancio tra le varie cascate stress-dipendenti.

B. Un modello per lo stress ossidativo nella formazione del tumore.

L'attivazione di alcuni oncogeni (per esempio c-ras) determina un aumento dei ROS intracellulari attraverso alterazioni dello "scavenging", del metabolismo e di ossidasi cellulari. L'eliminazione delle cellule mutate avviene con senescenza prematura o apoptosi. Alcune cellule possono "sfuggire" a questo controllo, e la continua esposizione agli ossidanti innesca instabilità genomica, mutazioni e infine tumore

L' EGF-R (Epidermal Growth Factor Receptor), Src Lyn, Fyn, Lck e recettori della famiglia delle MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) ovvero ERK 1 e 2 (Extracellular signal-regulated protein kinase, p42 e p44), p38 MAPK e JNK (c-Jun N-terminal Kinase) (7, 8, 9).

I bersagli cellulari a valle dei ROS non sono stati completamente definiti. Una classe di proteine attivata dai ROS è rappresentata dalle chinasi, enzimi che fosforilano proteine bersaglio in residui di serina, treonina o di tirosina (7). La via di trasduzione del segnale meglio caratterizzata dei recettori tirosina-chinasi è quella Ras/Raf/MEK/ERK, che controlla proliferazione cellulare, differenziamento, apoptosi (10). Un altro effetto indotto dai ROS è l'inibizione delle proteine tirosina-fosfatasi. Le basi molecolari di tale evento implicano modificazioni dipendenti dallo stress ossidativo di alcuni residui di cisteine che fanno parte del sito catalitico di tali enzimi (11, 12). I ROS possono anche regolare l'attività dei fattori di trascrizione, che dipende, almeno in parte, dallo stato redox di alcune cisteine conservate (13). Nel laboratorio dove ho svolto la tesi di dottorato è stato dimostrato che modificazioni dell'ambiente redox cellulare riducono l'efficienza di legame al DNA di alcuni fattori trascrizionali quali Sp1, il recettore per i glucocorticoidi e il fattore Erg (13).

Un altro fattore trascrizionale controllato da modificazioni redox-dipendenti è Nrf2 (NF-E2 related factor) (14). Esso non possiede una cisteina sensibile a variazioni redox nel dominio di legame al DNA, ma in condizioni basali è sequestrato nel citoplasma da Keap1, una proteina del citoscheletro (15) che possiede alcuni residui di cisteina con funzione di "sensori" (16). Lo stress ossidativo, modificando tali cisteine, induce il distacco di Nrf2 che può così migrare nel nucleo. Anche il fattore trascrizionale p53 possiede alcuni residui

di cisteina ridotti che sono cruciali per il suo legame al DNA (27): mutazioni di questi residui di cisteina sono stati trovati in molti cancro umani (17).

I ROS sono dei regolatori dell'apoptosi, un programma di morte cellulare che svolge un ruolo fisiologico durante lo sviluppo dell'organismo e provoca l'eliminazione di cellule danneggiate, prevenendo così l'insorgenza del cancro. L'apoptosi comporta rilascio nel citosol di proteine mitocondriali come citocromo c, aif, (apoptosis-inducing factor), Smac/DIABLO e l'attivazione di una serie di proteine effettrici denominate caspasi, capaci di attivare meccanismi di condensazione della cromatina, frammentazione del DNA e distruzione delle membrane cellulari (18). I ROS regolano l'apoptosi in quanto inducono l'apertura dei pori sulla membrana mitocondriale con rilascio di fattori pro-apoptotici (19) e inoltre inducono l'attivazione di varie cascate di segnali tra cui attivazione di p53 (20, 21), il cui ruolo in tale processo sarà meglio discusso più avanti.

Sin dalla pubblicazione della teoria di Harman (22), che sostiene che l'invecchiamento dei mammiferi è associato all'accumulo di danni ossidativi indotti dai ROS nel DNA, nelle proteine e nei lipidi (23, 24), numerose evidenze sperimentali hanno confermato che esiste una correlazione tra aumentata resistenza allo stress ossidativo e longevità (25).

Molti dati sperimentali provenienti da vari laboratori, incluso il nostro (26), hanno dimostrato che l'esposizione di cellule primarie in coltura a stress di varia natura tra cui uno stress ossidativo moderato prolungato, induce un arresto irreversibile della crescita, definito senescenza cellulare (27). Questa risposta, che contribuisce all'invecchiamento tissutale e che viene interpretata come meccanismo di protezione *in vivo* contro l'insorgenza del cancro nonché

un'alternativa all'apoptosi stessa, richiede, almeno in alcune cellule, l'attività di p53, "il guardiano" del genoma (28). E' interessante notare che alcuni oncogeni attivati, tra cui il *K-rasV12*, capaci di stimolare proliferazione cellulare non regolata, inducono *in vivo* la senescenza cellulare (29) e che tale processo è mediato da un aumento di ROS intracellulari (30).

Una spiegazione di come i ROS partecipano a processi così diversi è che il loro effetto dipende dalla quantità e dalla durata del "burst" ossidativo, anche se non è noto come la cellula opera un controllo sulla qualità e sulla quantità dei ROS. Certamente il livello dei ROS nella cellula è sotto stretto controllo in quanto, come già detto, una loro eccessiva produzione comporta effetti citotossici, mentre a basse concentrazioni ROS specifici agiscono da secondi messaggeri.

Come già discusso, un'esposizione della cellula ai ROS può indirizzare verso l'apoptosi o la senescenza cellulare. Tuttavia la continua esposizione ai ROS può indurre mutazioni a carico del DNA con instabilità genomica che risulta essere alla base della trasformazione neoplastica (31 e Figura 1B).

E' di interesse notare che le cellule trasformate producono elevati livelli di ROS, in particolare di H_2O_2 (32). Tale esposizione ai ROS nelle cellule maligne può indurre proliferazione cellulare, accumulo di danni al DNA con mutazioni e aumento dell'espressione di geni antiossidanti. Ciò comporta anche alterazioni nella resistenza di tali cellule ad agenti antitumorali (33).

1.2 *Resistenza allo stress ossidativo*

I fenotipi molecolari che caratterizzano la resistenza cellulare allo stress ossidativo sono associati ad espressione elevata di enzimi antiossidanti e di sistemi di riparo del DNA, così come ad attivazione di geni che inducono

arresto del ciclo cellulare e resistenza all'apoptosi. Ciò si realizza con modificazione del profilo di espressione genica e numerosi studi hanno indicato un ruolo importante di alcune proteine (FOXO, p66shc, SIRT, Nrf2, p53) nella comparsa di un fenotipo cellulare resistente allo stress ossidativo.

Studi genetici sulla regolazione della durata della vita negli organismi inferiori (34) dimostrano una forte correlazione tra resistenza cellulare allo stress ossidativo ed allungamento della durata della vita (4, 35). In particolare, nel verme *C. elegans*, FOXO/DAF-16 è coinvolto nell'allungamento della vita attraverso la regolazione coordinata di numerosi geni che provocano arresto del ciclo cellulare (p27^{Kip1}), nel riparo del DNA (GADD45) e nella detossificazione dei ROS (MnSOD e Catalasi) (36). Sull'invecchiamento nei mammiferi si sa molto meno, ma tra i vari parallelismi che sono emersi, alcuni risultati sono di particolare rilievo e sono in linea con l'ipotesi che l'aumentata resistenza allo stress ossidativo è alla base della longevità (37). Primo, i topi p66shc ^{-/-} che hanno una durata di vita 30% più lunga della loro controparte normale, sono più resistenti allo stress ossidativo (38). Secondo, topi knockout per sirtuina (SIRT6), una istone deacetilasi NAD-dipendente di mammifero (39), mostrano un fenotipo simile all'invecchiamento precoce (40). Un altro membro della famiglia delle sirtuine, SIRT1, regola numerosi fattori di trascrizione tra cui FOXO e p53. Terzo, è stato riportato che topi modificati geneticamente, in cui sono stati aumentati i livelli di p53 e del suo regolatore positivo ARF, hanno una vita più lunga e una riduzione dei danni ossidativi (27).

Anche il fattore trascrizionale Nrf2 è implicato nella resistenza cellulare allo stress ossidativo e verrà descritto nel prossimo paragrafo (41).

Di interesse più recente, è stata riportata una correlazione tra resistenza allo stress ossidativo e resistenza alla chemioterapia. Infatti, molti agenti chemioterapici inducono apoptosi *via* stress ossidativo (42). Poiché l'esposizione ad agenti che inducono i ROS può comportare la selezione di cloni resistenti allo stress, questo evento potrebbe contribuire alla resistenza delle cellule neoplastiche alla chemioterapia.

1.3 Nrf2 e la risposta allo stress ossidativo

La risposta cellulare allo stress ossidativo può essere suddivisa in tre fasi. Durante la prima fase un fattore cellulare agisce da “sensore” del cambiamento dello stato redox della cellula, nella seconda fase il segnale viene trasdotto al macchinario della trascrizione e, nella terza fase, viene attivata la trascrizione di un gruppo di geni coinvolti nella protezione dallo stress cellulare. Questo processo è altamente controllato attraverso la funzione coordinata di molti fattori di regolazione tra cui Nrf2. (14, 15, 43). Nrf2 appartiene ad una famiglia di proteine che comprende p45 NF-E2, Nrf1, Nrf2 e Nrf3 e che possiedono un motivo di legame al DNA del tipo cerniera di leucina con un dominio basico adiacente (bZIP) (44). Nrf2 è un potente attivatore trascrizionale e riconosce un elemento di sequenza chiamato “antioxidant/electrophile responsive element” (ARE/EpERE) presente, talvolta anche in copie multiple, sul promotore dei geni da esso regolati (14, 43, 91). Nrf2 funziona come eterodimero con una delle proteine della famiglia Maf., richieste *in vivo* per l'attività transattivante di Nrf2 (44).

L'attività di Nrf2 è regolata a vari livelli e con diversi meccanismi (14), tra cui il più studiato è il sistema Nrf2/Keap1 basato sulla disponibilità nucleare di

Nrf2 stesso. Infatti, Nrf2 normalmente è sequestrato nel citoplasma da Keap1, una proteina del citoscheletro, a sua volta complessata a Cul3 che fa parte del sistema di ubiquitinazione. In tal modo Nrf2 viene continuamente ubiquitinato e degradato da parte del proteasoma 26S (45).

Da studi *in vivo*, condotti su topi in cui è stato inattivato il gene di Nrf2, è stato visto che il numero di geni regolati da Nrf2 è elevato, maggiore di 200. Questi geni possono essere indotti da stress ed agenti di varia natura. In tabella sono schematizzati gli induttori e i geni bersaglio del sistema Nrf2/Keap1.

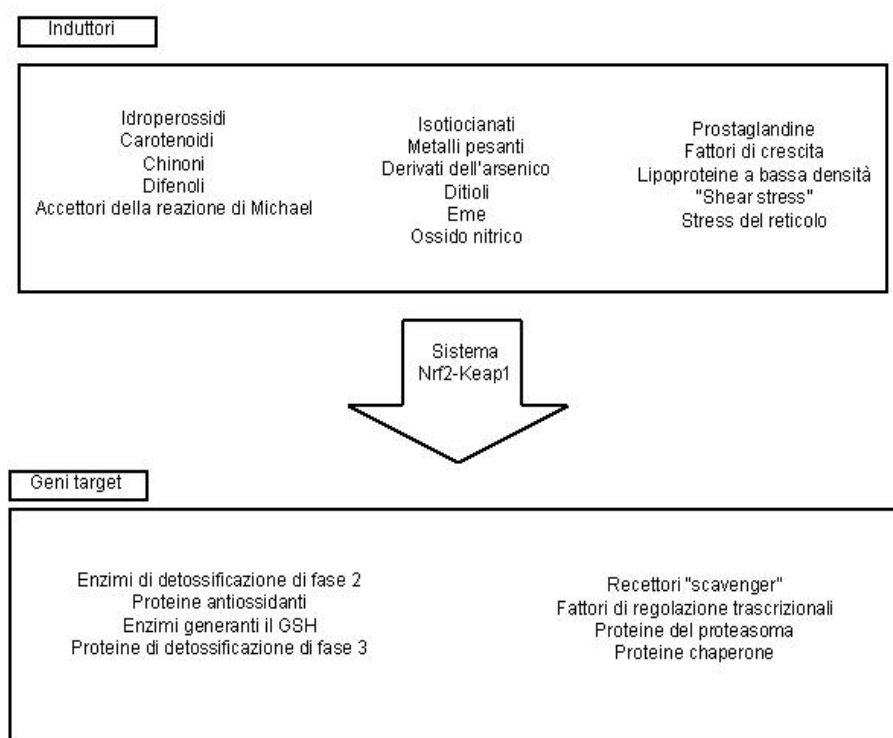


Tabella 1 *Induttori e geni bersaglio del sistema di regolazione Nrf2/Keap1*

Nrf2 svolge un ruolo critico nella regolazione dell'espressione dei geni che codificano per la famiglia delle GST (enzimi di fase 2), per l'NAD(P)H chinone ossidoreduttasi (14). per altri enzimi della fase 2 (l'UDP glucoronil-

trasferasi 1A6 e l'aldeide reduttasi) e per proteine antiossidanti quali l'eme-ossigenasi 1, la superossido dismutasi, la catalasi, la glutazione perossidasi, la tioredossina (14). Inoltre Nrf2 controlla sia l'induzione che il livello basale dell'espressione di geni che codificano enzimi coinvolti nella biosintesi del glutatione (GSH), in particolare del gene della γ -glutamyl cisterna sintasi (γ -GCS) e del gene x-CT che codifica per una subunità del trasportatore proteico dimerico cistina/glutammato (46). Il GSH è un tripeptide derivato da glicina, glutammato e cisteina e contiene un gruppo tiolico fornito dalla cisteina, che serve come centro reattivo antiossidante. Nrf2 controlla anche enzimi coinvolti nella detossificazione degli xenobiotici coniugati a GSH (enzimi di fase 3) (14) e la proteina associata alla multi-resistenza a farmaci (47). Esistono inoltre evidenze che la maggior parte delle subunità del proteasoma 26S e la classe delle proteine "Heat-shock" sono indotte da Nrf2 (48). L'attivazione non regolata della trascrizione dei geni antiossidanti e di quelli di fase 2 o la loro espressione costitutiva elevata può rendere la cellula più resistente a un successivo stress anche di maggiore entità. Si può quindi ipotizzare che una deregolazione del sistema Nrf2/Keap1 può essere alla base della resistenza allo stress ossidativo e probabilmente alla chemioterapia.

1.4 *p53 nelle funzioni cellulari*

La proteina p53, in quanto soppressore di tumore, svolge un ruolo centrale nella risposta cellulare ad una varietà di stress ambientali e intracellulari, incluso agenti che causano danni al DNA, stress ossidativo, ipossia e alterazioni della proliferazione cellulare (49). Le cellule con p53 funzionante rispondono a tali stress attivando un programma di arresto del ciclo

cellulare/senescenza oppure di apoptosi se il danno è notevole. In caso di mancata funzione di p53, questa coordinazione viene meno con conseguente crescita cellulare non controllata. E' noto infatti che il 50% dei tumori presenta mutazioni a carico di p53 (17). I diversi segnali di stress vengono trasdotti principalmente attraverso la capacità di p53 di agire come fattore trascrizionale e di regolare l'espressione di numerosi geni che controllano la progressione del ciclo cellulare, l'apoptosi, il riparo del DNA e funzioni coinvolte nella risposta agli stress (50). Normalmente, la proteina p53 nelle cellule di mammifero, in assenza di stress sia genotossici che non, è presente a bassi livelli ed ha un'emivita molto breve (6-20 minuti) (51, 52). In seguito a stress, si ha accumulo marcato e attivazione della proteina p53. Il processo di regolazione può essere diviso in tre fasi: attivazione, fase effettrice e fase finale. Per poter attivare una risposta biologica efficiente, i livelli di p53 devono raggiungere una certa quota e la sua attività specifica deve anche essere incrementata. I bassi livelli di p53 sono dovuti alla sua continua degradazione da parte del proteasoma 26S, guidata dalla ubiquitinazione in diverse lisine della regione C-terminale di p53, ad opera del complesso Mdm2-E3. E' quindi possibile che i bersagli principali delle vie di trasduzione di segnali più frequenti siano quelli che contrastano l'attività di Mdm2. Nella regione N-terminale, la fosforilazione della Ser15, Ser20 e Ser37, indotta sia dalle radiazioni IR che da radiazioni UV, stabilizza p53 (53,54). Inoltre la fosforilazione di altri residui di serine nella regione N-terminale può aumentare l'interazione di p53 con i transattivatori p300/CBP e PCAF (55, 56). Tra le chinasi attivate in seguito a stress genotossici a valle delle quali si ha l'attivazione di p53, c'è ATM che risponde ai danni dovuti ad esposizioni a radiazioni ionizzanti (IR) (57) e ATR

(A-T and Rad3-related) per le radiazioni UV-C (58). Sono state documentate anche numerose e varie modificazioni dei residui del C-terminale, che comprendono acetilazione, ubiquitinazione, sumoilazione e neddilazione. Nella regione C-terminale, la fosforilazione della Ser315 e della Ser392 regolano lo stato di oligomerizzazione di p53 (59) e la sua capacità di legarsi al DNA in maniera sequenza specifica (60). Anche l'acetilazione di residui di lisine C-terminali attiva il legame al DNA sequenza specifico di p53 e impedisce l'ubiquitinazione (61) ad esempio la Lys373 e la Lys382 vengono rapidamente acetilate da CBP/p300 in seguito al danno al DNA (59). Una volta attivata, p53 può “decidere” (fase effettrice) quali geni vanno attivati (o repressi) perchè individua il suo sito di legame ed interagisce con il “core” della macchina trascrizionale per attivare o reprimere la trascrizione. Tuttavia non sono noti i meccanismi con cui p53 può scegliere promotori differenti in situazioni diverse e come p53 decide per la via apoptotica o di arresto del ciclo cellulare(62). Oltre alle modifiche post-traduzionali, un ruolo importante è svolto dalle interazioni di p53 con altre proteine cellulari, e i due meccanismi non sembrano mutuamente esclusivi. Alcune interazioni proteiche disattivano p53, mentre altre si comportano come cofattori (20, 62).

Nella fase finale p53 è capace di indurre un “blocco di emergenza” del ciclo cellulare per impedire alle cellule il cui DNA è stato danneggiato di propagare potenziali alterazioni geniche (52), talvolta l'arresto del ciclo diventa permanente (senescenza cellulare) (27). Evidenze *in vivo* dimostrano che la funzione principale di p53 è quella di indurre un programma di apoptosi (63).

L'arresto del ciclo cellulare da parte di p53 avviene soprattutto in seguito all'attivazione trascrizionale del gene che codifica per p21^{WAF1/CIP1}, un inibitore

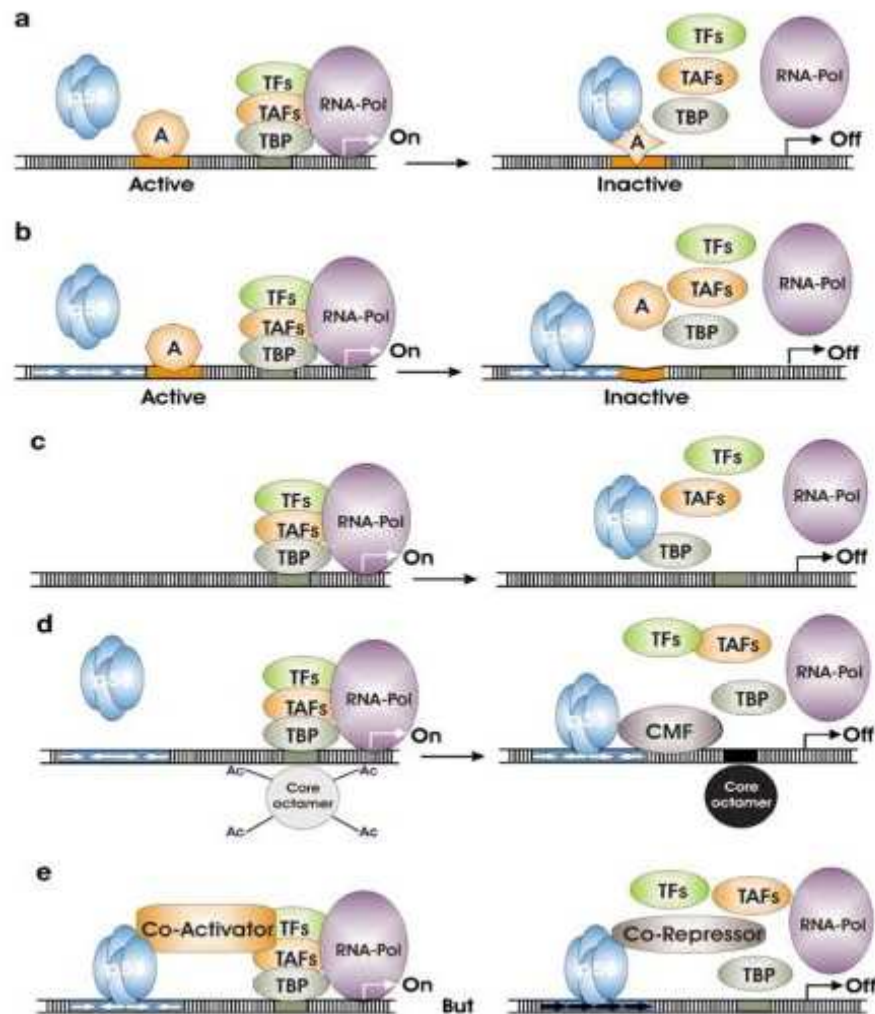
delle chinasi ciclino-dipendenti (CDK) (64), necessarie per la progressione del ciclo cellulare, con arresto del ciclo in G1. Blocco del ciclo cellulare può avvenire anche in G2/M mediante attivazione dei geni GADD45 (65) e 14-3-3 σ (66). Come p53 favorisce il processo dell'apoptosi è meno chiaro dell'arresto del ciclo cellulare. Esistono evidenze per cui, nel contesto di tale processo, p53 svolge sia funzione di attivatore di geni pro-apoptotici (BAX, NOXA, CD95, APAF-1) (67) che interazione diretta con alcune proteine anti-apoptotiche con dominio BH3 (ad esempio Bcl2) o pro-apoptotiche per regolare a livello della membrana mitocondriale il rilascio del citocromo c (21). In questo contesto l'apoptosi indotta da p53 dipende almeno in parte dall'accumulo di ROS. E' stato dimostrato che p53 possiede sia effetti pro-ossidanti (68) che anti-ossidanti (69). Questi due effetti opposti sono dovuti all'induzione dell'espressione da parte di p53 di geni pro- ed anti-ossidanti, rispettivamente. Le funzioni antiossidanti di p53 sono associate ad induzione di geni bersaglio tra cui la glutatione perossidasi (70) e la sestrina Hi95 (71) che abbassano i livelli dei ROS durante uno stress fisiologico, non letale. Al contrario, gli effetti pro-ossidanti sono la conseguenza dell'induzione di geni pro-apoptotici definiti PIG (p53 induced genes) che codificano per proteine la cui attività provoca un aumento dei ROS intracellulari (72). Entrambi gli effetti sono componenti importanti dell'attività di soppressore di tumori di p53.

1.5 *p53 come repressore trascrizionale*

L'elemento di riconoscimento *consensus* di p53 (RE) contiene due coppie di cinque basi posizionate testa-testa (5'-PuPuPuC(A/T)(A/T)GPyPyPy-3' (Pu è una purina, Py è una pirimidina) separate tra loro da 0-13 nucleotidi (73). Le

sequenze all'interno dei pentameri e gli orientamenti influenzano sia il legame che l'attività di p53. Comunque p53 può riconoscere anche sequenze che differiscono dalla consensus (28). La proteina p53, attiva come fattore trascrizionale, consiste di un tetramero formato da quattro subunità identiche. Ogni monomero è un polipeptide di 393 aminoacidi in cui si possono individuare: un dominio N-terminale di transattivazione (TAD) (a.a. 1-101), un dominio centrale di legame al DNA (DBD) (a.a. 102-292) e un dominio C-terminale (CTD) (a.a. 293-393) (74). Il dominio TAD è caratterizzato da un dominio di transattivazione "acidico" con residui di glutammico e aspartico e da un dominio ricco di residui di prolina (74). Il DBD possiede delle regioni cruciali per l'interazioni tra p53 e il DNA e si organizza in una conformazione a foglietto β con catene antiparallele, elemento portante del dominio di legame al DNA formato da due anse tenute insieme da un atomo di zinco coordinato a tre cisteine e ad una istidina (74). Il dominio C-terminale possiede una regione basica di legame al DNA. Studi recenti suggeriscono che CTD serve alla specificità di legame di DBD sul genoma svolgendo così una funzione regolatoria.. Per attivare la trascrizione, p53 segue diversi meccanismi molecolari. Il primo assume che la regione del promotore del gene attivato da p53 non è accessibile ai fattori generali della trascrizione e all'RNA polimerasi. In tal modo, il legame di p53 sul promotore faciliterebbe l'apertura reclutando sia fattori di rimodellamento della cromatina (CRF) (75) che istone transacetilasi (HAT) (76) come CBP/p300 e/o metiltrasferasi. Un altro meccanismo prevede che p53 faciliti la formazione del complesso di preinizio attraverso interazione diretta con i componenti del mediatore (76). Infine p53 può stimolare la trascrizione reclutando i fattori basali della trascrizione (28).

E' stato anche dimostrato che p53 può sopprimere la trascrizione di alcuni geni (77). Il meccanismo molecolare della regolazione negativa della trascrizione da parte di p53 sembra essere diverso dall'attivazione (78, 79 e referenze contenute in esse). Innanzitutto, p53 può inibire la trascrizione dei geni trascritti dalla RNA Polimerasi I, II e III. Riguardo all'inibizione della RNA Polimerasi II, sono stati proposti sinora cinque meccanismi di repressione, che talvolta si combinano, mostrati nella Figura 2 (79). Nel primo meccanismo la repressione avviene senza legame di p53 ad elementi di sequenza del DNA. In tale contesto, gli attivatori della macchina basale della trascrizione vengono inibiti via interazione diretta con p53, (Figura 2-a, 80). Il secondo meccanismo prevede che p53 reprime mediante "spiazzamento" degli attivatori trascrizionali dei geni dai rispettivi siti di legame o dai siti di legame al DNA che contengono una sequenza che si sovrappone con quella di p53 (Figura 2-b 81, 82). Il terzo meccanismo prevede che p53 reprime i geni bersaglio mediante interferenza diretta con l'assemblaggio della macchina trascrizionale. (Figura 2-c, 81, 82, 83). Il quarto meccanismo implica che p53 reprime il promotore reclutando le istone deacetilasi (HDAC) che provocano una chiusura della cromatina (Figura 2-d, 84). Tale regolazione è forse la più complessa e può essere mediata da altre proteine come mSin2a (84, 85) e SnoN (86). Infine, il quinto meccanismo prevede che l'inibizione del gene avviene attraverso il legame di p53 a nuovi elementi di sequenza che comporta una architettura particolare con funzione repressoria (Figura 2-e 87). Qualunque sia la natura della repressione p53-dipendente, essa richiede p53 attivo e funzionante. Infatti mutazioni in quasi tutti i domini di p53 possono abrogare l'effetto inibitorio di p53. E' interessante che per la repressione venga richiesto



Adattata da Laptenko O, and Prives C. (2006) Cell Death Differ. **13** 951-61.

Figura 2 Meccanismi di repressione trascrizionale di p53

(a) p53 reprime la trascrizione attraverso modificazione conformazionale di uno specifico attivatore *via* interazione proteina-proteina. In questo contesto p53 non lega direttamente il DNA.

(b) p53 blocca la trascrizione in seguito a legame con il DNA che determina un distacco della macchina trascrizionale.

(c) la repressione p53-dipendente è determinata dall' interazione della proteina p53 con fattori basali della macchina trascrizionale.

(d) p53 reprime la trascrizione attraverso il reclutamento di fattori che modificano la cromatina con conseguente modificazione del "core" istonico e chiusura del promotore.

(e) l'inibizione trascrizionale avviene in seguito al legame di p53 a nuovi elementi di sequenza (mostrati con un colore diverso) che comporta una architettura della macchina trascrizionale con funzione repressoria.

un DBD funzionalmente attivo anche quando il legame di p53 al DNA non è necessario. In questo contesto va notato che i promotori di alcuni geni che sono repressi posseggono uno o più elementi responsivi a p53, che però non partecipano alla regolazione mediata da p53 (88, 89). Il promotore del gene del piccolo RNA nucleare U1 contiene un p53-RE ad alta affinità che tuttavia non è indispensabile per la repressione di U1 mediata da p53 (89). Recentemente è stata descritta la repressione trascrizionale del gene MDR1 con un legame di p53 ad un sito “RE di repressione” (87) dove l’orientamento dei pentameri è del tipo “testa-coda” invece di “testa-testa”. Il cambiamento dell’orientamento verso la condizione testa-testa “normale” comporta un’attivazione significativa del gene di MDR1. Gli stessi autori propongono che l’inibizione di diversi altri geni (ciclina A, ciclina B1, e ARF) sia regolata con questo meccanismo, in quanto nell’ambito del loro promotore sono stati identificati RE testa-coda identici (90). p53 inibisce anche l’espressione dei geni trascritti da Polimerasi I e III (91, 92). La trascrizione diretta da Polimerasi I è repressa in quanto p53 interferisce con l’assemblaggio di un complesso di inizio produttivo sul promotore degli RNA ribosomali, mentre la trascrizione dei tRNA sembra essere repressa direttamente attraverso interazione con i componenti della macchina trascrizionale di Polimerasi III e indirettamente attraverso un meccanismo di degradazione p53-dipendente di TFIIB (93). A dimostrazione di ciò, la sintesi degli RNA ribosomali e dei tRNA è aumentata in fibroblasti di topo knockout per p53 (94).

1.6 Scopo della ricerca

Nonostante i notevoli progressi fatti negli ultimi anni nella comprensione degli effetti delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) sulle cellule e sulla fisiologia animale, numerosi punti restano ancora oscuri. Uno di questi riguarda i meccanismi molecolari che sono alla base della resistenza allo stress ossidativo.

L'interesse sviluppato in questo campo negli ultimi anni è stato notevole in quanto la resistenza allo stress ossidativo è correlata all'invecchiamento/senescenza, al cancro e alla resistenza alla chemioterapia. Numerosi studi indicano che cellule resistenti allo stress ossidativo attivano un programma specifico e complesso di espressione genica e risultati provenienti da vari laboratori indicano un ruolo di alcune proteine cardine tra cui p53 ed Nrf2. Tuttavia i meccanismi molecolari con cui tali proteine possono mediare questo programma genico non è stato ancora compreso.

Scopo della presente tesi è stato quello caratterizzare il ruolo di Nrf2 e p53 nella regolazione di alcuni geni antiossidanti che sono risultati iperespressi in cloni cellulari resistenti allo stress ossidativo indotto dal DEM, da noi precedentemente isolati. In particolare abbiamo valutato una possibile “comunicazione” tra le “cascate” di segnale controllate da questi due fattori trascrizionali. A tale scopo è stato condotto uno studio rivolto ad esplorare: i) i meccanismi di regolazione trascrizionale di geni Nrf2-dipendenti responsabili della resistenza allo stress ossidativo; ii) il ruolo della proteina p53 sull'espressione di questi geni antiossidanti; iii) i meccanismi molecolari con cui p53 esplica i suoi effetti inibitori sui promotori dei geni Nrf2- dipendenti.

2. MATERIALI E METODI

2.1 *Culture cellulari*

Le colture cellulari utilizzate in questo lavoro sono state: NIH3T3 (fibroblasti embrionali di topo); cloni da esse derivate (NIH-DEM-3, NIH-DEM-5, NIH-DEM-12, NIH-DEM-21); Hepa 1-6 (epatocarcinoma di topo); Calu-6 (carcinoma polmonare umano); HEK293 (carcinoma renale embrionale umano) e due linee cellulari (carcinoma di colon umano): le HCT 116 +/+ con p53 funzionante e normale e le HCT 116 -/- con p53 inattivato per ricombinazione somatica (28). Le cellule NIH3T3 e i cloni sono state cresciute in mezzo Eagle modificato secondo Dulbecco (DMEM) supplementato con 10% di Calf Serum e con 100 Unità/ml di penicillina e 100mg/ml di streptomicina. Le cellule Hepa 1-6, Saos-2 e HCT116 in DMEM al 10% di FBS e 100 Unità/ml di penicillina e 100 mg/ml di streptomicina (Biowhittaker), per le cellule Calu-6 si aggiungevano anche 2 mM di L-glutamina e 0,1 mM di aminoacidi non essenziali. Le cellule sono state cresciute a 37° C in un'atmosfera di CO₂ al 5%.

2.2 *Estrazione dell'RNA e reazione della trascrittasi inversa*

L'RNA totale è stato isolato usando l'Rneasy Mini Kit (Qiagen). In breve, le cellule venivano lisate nel tampone della casa e il lisato veniva passato sulle colonne di estrazione. L'RNA veniva eluito dalla resina con H₂O a 65°C e quantizzato mediante misura delle OD allo spettrofotometro. Per un'analisi qualitativa veniva effettuata un gel di agarosio in condizioni denaturanti con formaldeide. La reazione della trascrittasi inversa (RT) veniva effettuata su 1µg di RNA totale per campione, nell'apparecchio Gene AMP PCR sistem 9700, nel tampone II di PCR (Perkinelmer) diluito a 1x, contenente MgCl₂ 5 mM,

DTT 10 mM, esameri random (pdN6) 5 μ M, dNTP 1 mM, inibitore dell'RNasi (1 U/ μ l) e RT (10 U/ μ l). Dopo denaturazione dei campioni a 70°C per 10 minuti, si procedeva alla seguente reazione: 25°C per 10 minuti, 42°C per 45 minuti, 99°C per 3 minuti. Un'aliquota del cDNA a doppio filamento, veniva utilizzato come tale negli esperimenti PCR real-time quantitativa.

2.3 *PCR real-time quantitativa*

La reazione di PCR real-time quantitativa avveniva nell'apparecchiatura iCYCLER SYSTEM (Biorad), su un'aliquota, pari ad 1/10, del prodotto della reazione della RT. Le condizioni di PCR prevedevano: 95°C per 5' e 40 cicli con 15" a 95°C e 1' a 60°C. Per la quantizzazione del prodotto di PCR veniva usato il Sybr Green ed il metodo dell'analisi comparativa (95) con il gene di riferimento c-ABL, il cui trascritto non varia nelle nostre condizioni. Il numero di volte di variazioni per un dato gene deriva dall'equazione $n = 2^{-\Delta\Delta C_t}$, dove il $\Delta\Delta C_t = \Delta C_{t_{\text{gene campione}}} - \Delta C_{t_{\text{controllo}}}$. Il ΔC_t controllo si ricava per differenza tra il C_t del gene in esame e quello di c-ABL nel campione controllo. Il ΔC_t del campione in esame è la differenza tra il C_t del gene in esame e quello del gene di riferimento c-ABL. La reazione di PCR avveniva in 25 μ l finali di cui 12,5 μ l di "Sybr Green PCR Master Mix 2x" (Biorad), oligonucleotidi senso (F) e antisenso (R) 0,3 μ M e 5 μ l di cDNA. Gli oligonucleotidi usati c-ABL, F:GGTATGAAGGGAGGGTGTACCA; R:GTGAACTAACTCAGCCAGAGTGTTGA; Gcl F: TGCGAAAAGTGCCCGT; R: TGCATTCCAAAACATCTGGAAA; Glutathione perossidasi4, F: TTA CTTAAGCCAGCACTGCTGTG; R: CCATGTGCCCCGTCGATGT; Manganese superossidodismutasi (MnSOD), F:GTCGCTTACAGATTGCTGCCT; R:AGGTAGTAAGCGTGCTCCCACA;

Perossiredossina 5, F: CAGAGTTTGCCAAGAGGAATGTTAA; R: GTTTCACCATTTGTAAGCATTGATGT; Glutathione S-transferasi alfa-1 (Gst α 1), F: CAGGTGGCTCCTAGCTGCA; R: GGTCTGCGCCAGCTTCA; Nrf2, F: GGCCCAGCATATCCAGACA; R: CCAGGGCAAGCGACTCAT; Keap1- F: CCACATCTACGCAGTCGGG; R: ACAGTTGTAACCGCGCTGAT; x-CT (Trasportatore cistina/glutamato), F: TACCTCAACTTTATTACTGAAGA AGTAGACAA; R: TGTCAGTACGTAGCCCACTGTGA; HO-1, (Emeossigenasi-1)F: GTGATGGAGCGTCCACAGC;R:TGGTGGCCTCCTT CAAGG; Catalasi, F: CGTCCCTGCTGTCTCACGTT; R: ATCTCCTATTGGGTTCCCGC; NQO1, F: CCCTCAACATCTGGAGCCA T; R: GCGTAGTTGAATGATGTCTTCTCTGA; GADD45, F: AGACCCCGGACCTGCACT; R: CCGGCAAAAACAAATAAGTTGACT

2.4 Plasmidi e trasfezioni

Per il clonaggio del costrutto di espressione FLAG-Nrf2, il cDNA della sequenza codificante di Nrf2 (I.M.A.G.E. 4548874) veniva digerito,insieme al vettore p3x FLAG-CMV 1-1 (Sigma), con gli enzimi di restrizione EcoRV e BamHI e clonato in frame con l'epitopo FLAG (Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys) all'estremità N-terminale. Il vettore di espressione pCMV-p53 è descritto in referenza 156. La regione del promotore di x-CT (-235 +15) è stata isolata per PCR usando come stampo DNA genomico di NIH3T3 e gli oligonucleotidi: CATGCAATAATAAGTATGGCCTAAGATT (F) ; CATTA CACACCAGCTCAGC (R). Il promotore di NQO1 umano -923+111 è stato ottenuto per PCR da DNA genomico delle cellule HEK293 con gli oligonucleotidi: TCCGGGTTCAAGCGATTCTCCTGCCTCAG (F) e GGCTCTGGTGCAGTCCGGGGCGCTGATTG (R). Le bande di PCR erano

digerite e clonate nel vettore pGL3 Basic (Promega) nei siti SacI/HindIII, a monte del gene della luciferasi. Per il clonaggio dei mutanti di delezione del promotore NQO1 delle regioni -754+111, -600+111 e -480+111 è stato utilizzato come stampo il costrutto NQO1/Luc con gli oligonucleotidi: ATGCAGGATCCGCTGGGATTACAGGCGTGA (F); ATGCAGGATCCA GTGGCATGCACCCAGG (F); ATGCAGGATCCAAATCCGCAGTCACA GT (F), rispettivamente e CCATCTTCCAGCGGATAGAA (R). Le trasfezioni t transienti venivano effettuate in triplicato con il metodo del precipitato con fosfato di calcio utilizzando 2 µg di DNA plasmidico “reporter” ed i vettori di espressione di p53 e/o Nrf2 (0,15 µg ciascuno) in presenza del vettore pRLSV40 (0,15 µg) che codifica per la luciferasi Renilla (Promega) utilizzata per normalizzare. Il giorno dopo il mezzo di coltura veniva cambiato e, dove indicato, dopo un’ora veniva aggiunta etoposide oppure DEM. Dopo 36 ore dalla trasfezione, si effettuava il saggio luciferasi con il protocollo descritto dal Dual Luciferase Reporter assay System (Promega). La trasfezione delle HEK293 veniva effettuata con lipofectamina 2000 (Invitrogen) seguendo le istruzioni fornite dalla casa produttrice.

2.5 Preparazione di estratti proteici nucleari e totali per Western blot

Per la preparazione di estratti nucleari le cellule lisate nel tampone di lisi 1x contenente 10 mM Hepes pH 7,8, 60 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 1 mM Na₃VO₄, 0,2% NP40 e 10 µg/ml degli inibitori di proteasi. Il lisato veniva centrifugato a 4°C (5’ a 2500 rpm). e il precipitato nucleare veniva lavato con il tampone di lisi senza NP40 e risospeso in 300 µl dello stesso tampone. Successivamente i nuclei venivano purificati su un cuscinetto di saccarosio al 30% per centrifugazione a 6000 rpm (15’ a 4°C). I precipitati

nucleari erano poi risospesi in 50 µl di un tampone contenente 250 mM Tris-HCl pH 8, 60 mM NaCl, 1 mM DTT, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM PMSF e 10 µg/ml di inibitori di proteasi e i nuclei venivano lisati con 3 cicli di congelamento e scongelamento (-80 °C e 37 °C). Le proteine nucleari venivano recuperate per centrifugazione (10' a 9500 rpm) a 4 °C e 15 µg venivano separate su gel denaturante di poliacrilammide al 10% contenente SDS alla concentrazione finale dell'1% e trasferite elettroforeticamente su membrana di nitrocellulosa (Immobilon-P, Millipore). I filtri venivano dapprima incubati per 1 ora a temperatura ambiente con una soluzione al 5% di latte in PBS 1x contenente 0,1% Tween e poi trattati con la soluzione contenente l'opportuna concentrazione di anticorpo primario (1 µg/ml per anti-Nrf1 e anti-Nrf2, 0,1 µg/ml per anti-p53, 0,2 µg/ml per anti-tubulina, 0,5 µg/ml per anti-FLAG e 0,5 µg/ml anti-pATM) a temperatura ambiente per 3 ore. Dopo l'incubazione con l'anticorpo primario e tre lavaggi con una soluzione di PBS-Tween 0.1%, si procedeva con l'anticorpo secondario (Proteina A Horseradish Peroxidase o anticorpo secondario anti-mouse IgG Horseradish). L'avvenuta interazione veniva visualizzata utilizzando il sistema di chemiluminescenza ECL (Amersham Pharmacia Biotech).

Gli estratti totali cellulari venivano effettuati su cellule lavate due volte con PBS 1x freddo e lisate a 4 °C per 30 minuti con un tampone fosfato contenente 0,1 mM EDTA, 1mM Na₃VO₄, 50 mM NaF, 0,5 % NP40, 1 mM PMSF e 10 µg/ml di inibitori delle proteasi. Il lisato cellulare veniva centrifugato a 4 °C (10' a 4000 rpm). 30 µg delle proteine totali del supernatante venivano utilizzati per l'esperimento di western blot secondo la procedura già descritta.

2.6 Saggi di Immunoprecipitazione della Cromatina (ChIP)

Le cellule Hepa 1-6 trattate come indicato e le cellule Calu-6 trasfettate 48 ore prima con il costrutto CMV-p53, Nrf2-FLAG o con entrambi, venivano incubate per 10' in presenza di 1% Formaldeide per consentire la formazione di legami crociati tra proteine e DNA ("cross-linking"). La reazione veniva fermata aggiungendo glicina 125 mM finale per 5' e le cellule, dopo un lavaggio con PBS, venivano raccolte e centrifugate a 4°C (5' a 1200 rpm). Successivamente esse venivano risospese in 2 ml di "Cell Lysis Buffer" (5mM PIPES pH 8.0, 85mM KCl, 0,5% NP-40, 1mM PMSF e inibitori delle proteasi 10µg/ml), lasciate in ghiaccio per 10' e poi centrifugate a 4°C (5' 5000 rpm). Il precipitato contenente i nuclei veniva risospeso in 2 ml di "Nuclear Lysis Buffer" (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA, 8% SDS, 1 mM PMSF e inibitori delle proteasi 10µg/ml), e sottoposto a sonicazione 5 volte per 30'' con intervalli di 30'' in ghiaccio. L'avvenuta sonicazione del DNA veniva controllata su gel di agarosio 1% valutando la formazione di frammenti di circa 1000 bp. I campioni venivano poi centrifugati a 4°C (20' 14000 rpm) e i sovranatanti diluiti in un rapporto di 1:4 con "Dilution Buffer" (10mM Tris-HCl pH 8.0, 0,5mM EGTA, 1% TritonX-100, 140 mM NaCl, 1mM PMSF e inibitori delle proteasi 10µg/ml). Un' aliquota del campione (300 µl) veniva diluito 1:2 con "Ripa Buffer" (10 mM Tris-HCl pH 8, 1mM EDTA, 0,5 mM EGTA, 1% Triton X-100, 0,1% Na-Deossicolato, 0,1% SDS, 140 mM NaCl) e sottoposto a "preclearing" con 30 µl di proteina-A agarosio (Amersham) per 1-2 ore a 4°C. Dopo centrifugazione (10' a 14000 rpm), il sovranatante veniva immunoprecipitato con l'anticorpo Anti-p53 (1 µg) o con l'anticorpo anti-

FLAG (1 µg) o con immunoglobuline IgG per tutta la notte a 4°C in agitazione. Successivamente al campione venivano aggiunti 30 µl di Proteina A agarosio per 4 ore a 4° C e centrifugato a 4°C (20'' a 14000 rpm). Il sovrantante del campione immunoprecipitato con IgG rappresenta l'“input”, mentre la resina dello stesso campione rappresenta il controllo negativo nell'analisi di PCR. Il precipitato della resina veniva lavato con: 1)“RIPA Buffer”, 2) “LiCl buffer” (0,25 mM LiCl, 0,5% NP40, 0,5% Na-Deossicolato, 1 mM Na-EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 8) e 3) TE (10mM Tris-HCl pH8.0, 1mM EDTA) e risospeso in 100 µl di TE e, insieme agli “inputs”, incubato a 65°C per tutta la notte per “decrosslinking”. Poi ogni campione veniva incubato con SDS 0,5% e 0.5 mg/ml Proteinasi K (Roche), a 50°C per 4 ore. Dopo centrifugazione si procedeva ad un' estrazione con fenolo/cloroformio/isoamil alcool (25:24:1), ad una con cloroformio ed a precipitazione con Na-Acetato/etanolo e glicogeno (100 µg/ml). Successivamente i precipitati di DNA venivano risospesi in 30 µl di TE e su 1 µl per gli “inputs” e 3-5 µl degli altri campioni si effettuava la PCR, utilizzando oligonucleotidi specifici per la regione in esame. Per valutare l'associazione di p53 ed Nrf2 al promotore endogeno del gene x-CT nelle Hepa 1-6 e nelle Calu-6 sono stati usati rispettivamente gli oligonucleotidi: F: ATCCAGAGCAACCCACA; R: CATTACACACCAGCTCAGCT; F: GCTT AGGTCAGTTGAGCAA; R: CATTACACACCAGCTCAGCT. Per valutare la specificità dell'immunoprecipitato venivano usati oligonucleotidi circa 2000 bp a monte delle sequenze ARE. Per il gene x-CT di topo nelle posizioni -2157 e -1956 : TCAAAGCCTGGTGCCATG; GATTAATGAGCATGAGGGAC e per il gene x-CT umano nelle posizioni 2002 e -1803: F:ATTCTGAGTGGTG

GCCTC; R: CTGAACTCATAAGTTGAGCC. Per l'associazione di p53 con i mutanti di delezione di x-CT/Luc venivano usati gli oligonucleotidi nella regione prossimale del gene della luciferasi F: CATTCCGGTACTGTTGGT AA; R: TCGAAGTACTCAGCGTAAGT e per valutare la specificità di legame gli oligonucleotidi: F: TTCGAGCAGACATGATAAGA; R: TTTGTA GAGGTTTACTTGCT, per la regione +1766+1986. Per l'associazione di p53 con il promotore umano endogeno di NQO1 venivano usati gli oligonucleotidi nelle posizioni -450 -250: F: GAGCCTCTGTACACACAC;R:CCTTGTGAG TCGCGT e per la specificità gli oligonucleotidi nelle posizioni -2295-2015: F: CCTATATAGTTCATGTTAACAA; R: GGATTACAGGCATGTGCCA. La reazione di PCR prevedeva: denaturazione a 95°C 30'', 40 cicli a 95°C 30'', 56°C 30'', 72°C 30''; 72°C per 7'. Dopo PCR i campioni venivano sottoposti ad elettroforesi su gel d'agarosio e visualizzati mediante colorazione con etidio bromuro.

2.7 Analisi dell'apoptosi al citofluorimetro (FACS)

Le cellule HCT116 venivano trattate con varie concentrazioni di DEM per 24 ore. Successivamente le cellule venivano raccolte in PBS 1x e centrifugate per 10' a 1100 rpm. Il pellet cellulare veniva risospeso in 400 µl di un tampone contenente 100 mM Hepes, pH 7.4, 1.5 M NaCl, 50 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 18 mM CaCl₂, e 10 µl di ioduro propidio. . L'analisi del DNA in citometria a flusso veniva eseguita utilizzando l'apparecchio FACSVantage (Beckton Dickinson, Mountain View, CA, USA) che monta un laser a ioni di argon raffreddato ad acqua (488 nm, 150 mw), software Cell Quest (Beckton Dickinson). L'analisi dei dati è stata effettuata utilizzando il programma di Mod-Fit (Verity, Software House, Inc.).

3. RISULTATI

3.1 Cellule resistenti allo stress ossidativo indotto dal DEM iperesprimono geni delle difese antiossidanti correlati ad un livello elevato di Nrf2 nel nucleo.

Nel laboratorio dove ho svolto il Corso di Dottorato di Ricerca erano state precedentemente isolate da cellule murine immortali NIH3T3 quattro linee cellulari -CL3, CL5, CL12, CL21-, capaci di sopravvivere all'apoptosi mediata dallo stress ossidativo indotto dal dietilmaleato (DEM) (96).

Per studiare il fenotipo molecolare responsabile della resistenza, abbiamo analizzato, attraverso la metodica della PCR real time quantitativa, il profilo di espressione di alcuni geni (elencati in Figura 3) correlati alle difese antiossidanti cellulari ed in particolare geni coinvolti in: i) metabolismo del GSH; ii) "scavenging" dei ROS; iii) risposta agli xenobiotici; e iv) meccanismo di riparo del DNA. Per misurare i livelli basali dell'mRNA di ciascun gene nei quattro cloni, abbiamo utilizzato cellule di cloni resistenti cresciute per circa un mese in assenza di DEM e le abbiamo confrontate con le cellule parentali NIH3T3. I risultati indicano che i quattro cloni iperesprimono alcuni geni antiossidanti con differenze significative nel profilo di espressione genica tra i vari cloni. Infatti, i livelli dell'mRNA del gene GST $\alpha 1$ che risulta iperespresso in tutti i cloni resistenti sono variabili, con un aumento che va dalle 3,7 volte nel clone NIH-DEM-21 alle 8,2 volte nelle NIH-DEM-12. In particolare, nel clone NIH-DEM-21, dove c'è un minore incremento di GST $\alpha 1$ si osserva anche iperespressione di GST p1, un altro membro della famiglia delle GST coinvolto nella resistenza ai farmaci e nella regolazione delle chinasi correlate allo stress (97). Inoltre, si osserva che l'mRNA del gene x-CT è aumentato in

tutti i cloni tranne che nel clone NIH-DEM-3. Anche l'mRNA per il gene NQO1 è presente a livelli più elevati in tutti i cloni tranne che nel clone NIH-DEM-5, dove invece è presente una consistente iperespressione dell'mRNA del gene della MnSOD, i cui livelli risultano normali in tutti gli altri cloni. Gli mRNA degli altri geni analizzati o sono espressi allo stesso livello delle cellule parentali, oppure risultano incrementati solo in qualche clone. Questi dati suggeriscono che i livelli elevati di mRNA dei geni GST α 1, x-CT e NQO1 sono associati alla resistenza allo stress ossidativo indotta dal DEM. Sulla base di tali risultati abbiamo deciso di investigare i meccanismi di regolazione responsabili della maggiore espressione dei geni GST α 1 e x-CT, osservati nel clone NIH-DEM-12. Pertanto abbiamo clonato le regioni promotrici dei geni GST α 1 (-940 a +41) e x-CT (-235 a +15) a monte del gene "reporter" della luciferasi e i due costrutti sono stati trasfettati in maniera transiente nelle cellule NIH3T3 e nel clone NIH-DEM-12, cresciuto nel mezzo normale senza DEM per un mese. I risultati hanno mostrato un'attività luciferasica significativamente più elevata nel clone NIH-DEM-12, suggerendo che l'aumento dei livelli di espressione di tali geni è regolato da meccanismi che agiscono a livello trascrizionale e dovuto alla maggiore presenza e/o maggiore attività di un fattore trans-attivante. E' noto che i promotori di tali geni contengono gli ARE che sono riconosciuti da Nrf2, il quale attiva la trascrizione dei rispettivi geni. Quindi abbiamo deciso, mediante esperimenti di Western blot, di analizzare la quantità della proteina Nrf2 presente negli estratti nucleari del clone NIH-DEM-12 e delle NIH3T3. Tali esperimenti sono stati condotti anche utilizzando estratti nucleari provenienti da cellule esposte a 100 μ M di DEM che induce l'accumulo di Nrf2 nel nucleo (15). I risultati, mostrati

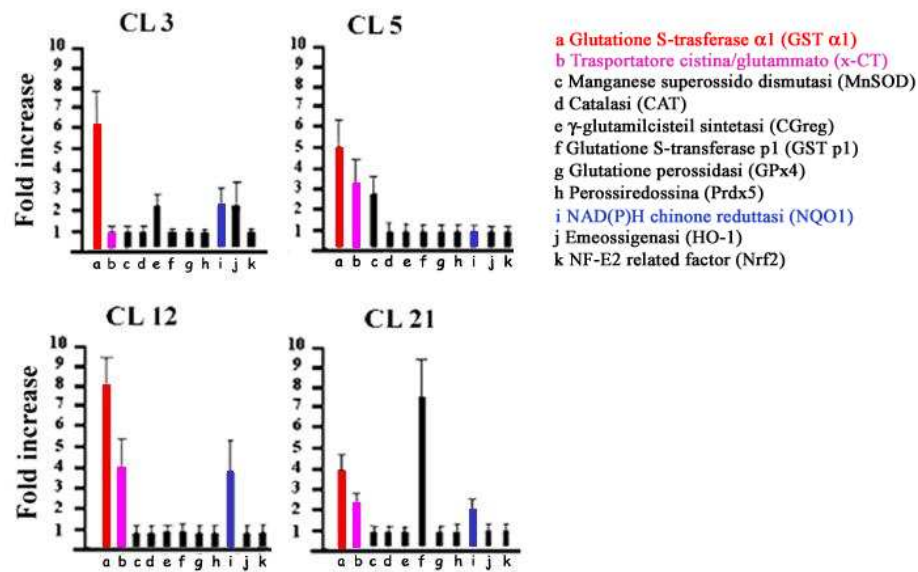
in Figura 3 B, indicano che nel nucleo delle cellule resistenti, i livelli basali della proteina Nrf2 e quelli accumulati dopo trattamento con DEM risultano significativamente più elevati rispetto a quelli osservati nelle cellule parentali nelle stesse condizioni. In queste stesse condizioni, i livelli della proteina Nrf1, un altro membro della famiglia di fattori correlati a Nrf2, regolata diversamente da Nrf2, risultano comparabili nei nuclei delle due linee cellulari.

Questi dati suggeriscono che l'aumento della trascrizione dei geni GST $\alpha 1$ e x-CT in condizioni basali nel clone resistente allo stress ossidativo è correlato a livelli nucleari più elevati della proteina Nrf2.

3.2 L'iperespressione di p53 interferisce con l'induzione mediata da Nrf2 dei promotori contenenti sequenze ARE.

I risultati precedentemente descritti ci hanno indotto a studiare meglio i meccanismi molecolari della regolazione dei geni antiossidanti Nrf2-dipendenti. Esperimenti di cotrasfezione in varie linee cellulari del costrutto x-CT -235 +15 (x-CT/Luc) e del vettore che iperesprime la proteina Nrf2 e sottoposte a stress ossidativo con DEM 200 μ M, avevano dimostrato che l'attività luciferasica era notevolmente ridotta in cellule con p53 funzionante. Ciò faceva supporre che lo stress ossidativo avesse indotto una funzione pro-ossidante di p53 attraverso un danno al DNA. Inoltre, da un'analisi di sequenza del promotore del gene x-CT avevamo individuato due putativi siti di legame per il fattore trascrizionale p53. La riprova di questa ipotesi era stata ottenuta trasfettando in modo transiente x-CT/Luc con un vettore che esprime p53: in queste condizioni l'attività luciferasica era notevolmente ridotta. Abbiamo

A



B

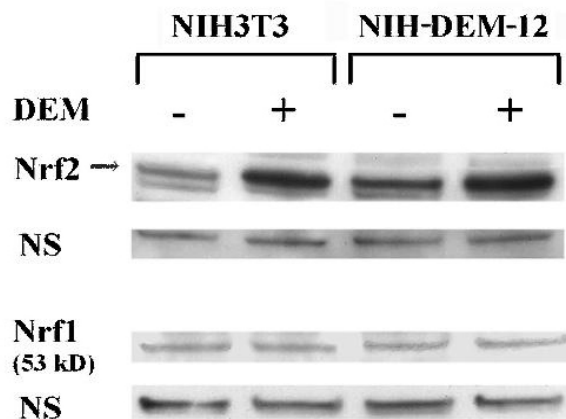


Figura 3 **Profilo dell'espressione genica dei cloni resistenti al DEM (A) e livelli di Nrf2 nel clone NIH-DEM-12 (B).**

Pannello A: I livelli di mRNA sono stati analizzati mediante PCR Real Time, in cloni resistenti allo stress ossidativo cresciuti per un mese in assenza di DEM. I valori sono stati ottenuti confrontando i livelli relativi di mRNA di ciascun gene delle cellule resistenti con quelli delle cellule NIH3T3. Per la quantizzazione è stato usato il metodo dell'analisi comparativa (metodo del $\Delta\Delta C_t$), utilizzando come gene di riferimento c-ABL. Gli istogrammi in colore mostrano i livelli dei geni GST $\alpha 1$, x-CT, NQO1

Pannello B. Analisi mediante Western blot dei livelli nucleari delle proteine Nrf2 e Nrf1 in cellule NIH3T3 e NIH-DEM-12 in condizioni basali e dopo trattamento con 100 μ M DEM. La normalizzazione è stata effettuata con una banda non specifica riconosciuta dagli anticorpi anti-Nrf2 e anti-Nrf1.

così deciso di studiare l'effetto di p53 sull'espressione di geni endogeni Nrf2-dipendenti. A tale scopo abbiamo trasfettato cellule HEK293 con il costrutto FLAG-Nrf2 in presenza e in assenza di un vettore di espressione per p53 ed abbiamo analizzato i livelli di mRNA dei geni endogeni x-CT e NQO1. Queste cellule sono state scelte perché la trasfezione con lipofectamina ci permetteva di ottenere un'elevata efficienza di trasfezione (maggiore del 50 %). Le cellule sono state raccolte dopo 48 ore dalla trasfezione e gli mRNA sono stati misurati mediante la tecnica della PCR Real Time. Come mostrato nell'istogramma della Figura 4, l'iperespressione di Nrf2 induce un aumento dei livelli di mRNA dei geni x-CT e NQO1 di circa tre volte mentre la coespressione di p53 abolisce quasi completamente tale induzione Nrf2-dipendente. Come controllo abbiamo misurato i livelli di mRNA del gene GADD45 che è noto essere indotto, a livello trascrizionale da p53. Come atteso, i livelli di questo mRNA non sono influenzati da Nrf2 mentre p53 induce un'accumulo significativo. Nel riquadro della stessa Figura sono mostrati i livelli di espressione delle proteine Nrf2 e p53 dopo trasfezione.

3.3 L'attività di p53 indotta da danno al DNA si contrappone alla risposta antiossidante Nrf2-dipendente.

I risultati riportati precedentemente possono essere spiegati ipotizzando che un accumulo di ROS, indotto dal DEM, provoca l'attivazione di p53 probabilmente in seguito ad un danno al DNA.

Allo scopo di studiare la regolazione dei geni x-CT e NQO1 da parte delle proteine p53 e Nrf2 endogene, abbiamo trattato le cellule Hepa 1-6 con etoposide, un agente che induce danno al DNA, alla dose di 100 μ M per 12

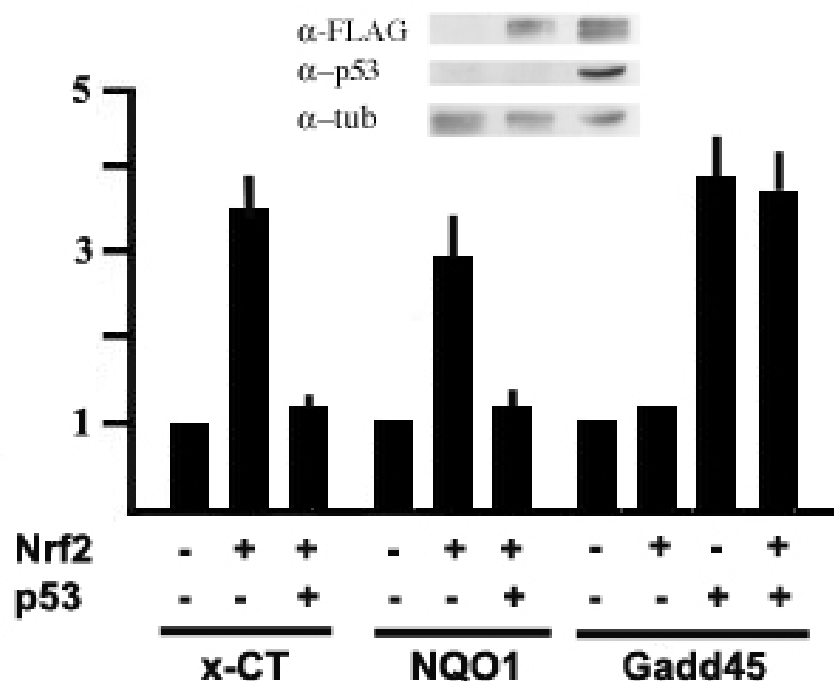


Figura 4. **p53 sopprime l'induzione Nrf2-dipendente degli mRNA dei geni endogeni x-CT e NQO1.**

Le cellule HEK293 sono state trasfettate con in vettore di espressione FLAG-Nrf2 in presenza e in assenza del vettore di espressione per p53. Dopo 36 ore dalla trasfezione le cellule sono state raccolte e i livelli relativi di mRNA sono stati misurati mediante PCR Real Time, come descritto nei materiali e metodi. Nel riquadro in alto è riportato un Western blot di controllo dei livelli di espressione di FLAG-Nrf2 e p53

ore, per attivare p53 endogeno. Successivamente queste stesse cellule sono state esposte a 200 μ M di DEM per 3 ore per attivare Nrf2 endogeno. I risultati di questi esperimenti sono riportati in Figura 5. Gli esperimenti sono stati condotti in parallelo con trasfezione transiente di x-CT/Luc per analizzare anche l'attività luciferasica nelle condizioni suddette (Figura 5 A, pannello di sinistra). In queste cellule, come atteso, la trascrizione del gene x-CT/Luc è attivata dal DEM e i trattamenti con etoposide non hanno effetto sull'attività luciferasica. Al contrario, l'attivazione della trascrizione indotta dal DEM è significativamente diminuita in cellule precedentemente esposte all'etoposide. La risposta dei geni endogeni x-CT e NQO1, analizzata nelle stesse condizioni sperimentali mediante PCR Real Time, ha dimostrato che gli mRNA di tali geni vengono indotti dal trattamento con il DEM ma che i pre-trattamenti con etoposide sopprimono significativamente tale risposta al DEM. Come controllo dei trattamenti abbiamo misurato i livelli di mRNA del gene GADD45 (Figura 5 A) e i livelli delle proteine p53 e Nrf2 mediante Western blot (Figura 5 C). In queste condizioni il DEM induce un accumulo nucleare di Nrf2 sia nelle Hepa 1-6 che nelle Calu-6 e non ha effetto sui livelli della proteina Nrf1, un altro membro della famiglia di proteine correlate ad Nrf2 (Figura 5 D).

Lo stesso esperimento condotto nelle cellule Calu-6, dove p53 è assente, dimostra che l'etoposide, non ha effetto né sulla trascrizione del costrutto "reporter" né sui livelli endogeni di mRNA del gene x-CT (Figura 5 B).

Per confermare che le risposte biologiche osservate fino ad ora nelle cellule Hepa1-6 e Calu-6 dipendessero solo da p53, abbiamo ripetuto questi stessi esperimenti nelle linee cellulari isogeniche HCT116 $+/+$ (con p53 normale e funzionante) e le HCT116 $-/-$ (in cui il locus TP 53 è stato inattivato per

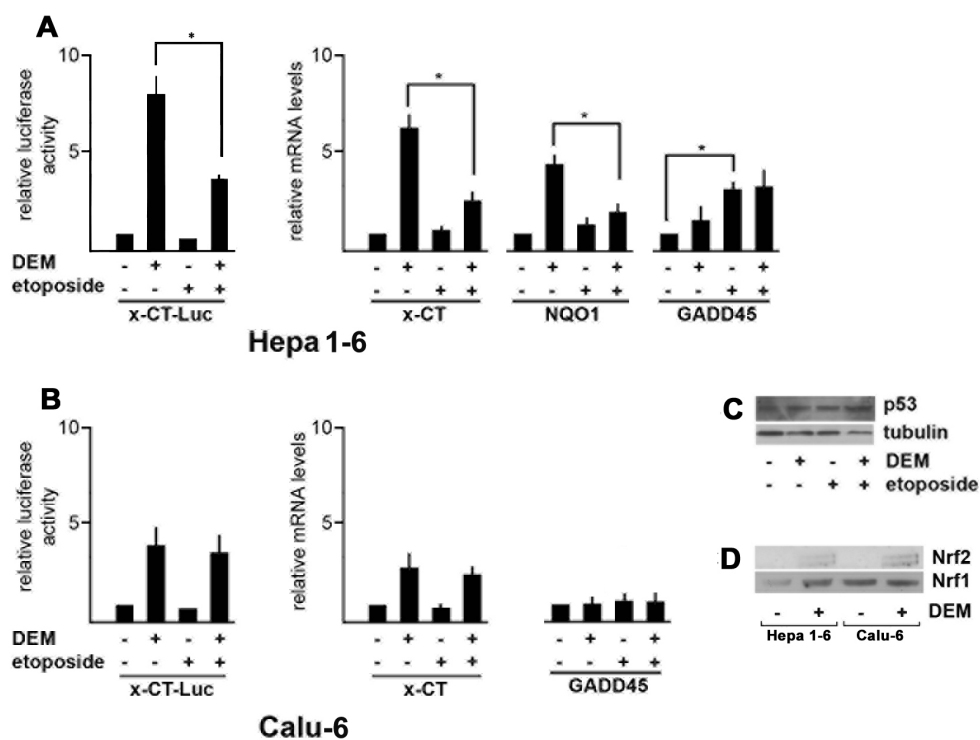


Figura 5. L'attivazione di p53 in seguito a danno al DNA reprime l'aumento della trascrizione DEM-dipendente di geni antiossidanti

Le cellule Hepa 1-6 (Pannello A) e le cellule Calu-6 (Pannello B) sono state trasfettate con x-CT/Luc. Dopo la trasfezione le cellule sono state trattate dapprima con etoposide (100 μ M per 12 ore) e poi con 200 μ M di DEM per 3 ore. A 48 ore dalla trasfezione le cellule sono state raccolte per saggiare l'attività luciferasica, e per misurare i livelli relativi di mRNA di x-CT, NQO1 e GADD45.

Pannello C. Analisi nelle cellule Hepa 1-6, mediante Western blot, dei livelli della proteina p53 dopo trattamento con etoposide e/o con DEM.

Pannello D. Analisi nelle cellule Hepa 1-6 e Calu-6, mediante Western blot, dei livelli nucleari delle proteine Nrf1 e Nrf2 dopo trattamento con 200 μ M di DEM.

ricombinazione somatica) (17). Tali cellule sono state quindi trasfettate con il costrutto x-CT/Luc in presenza e in assenza del vettore di espressione FLAG-Nrf2 e trattate con 200 μ M di etoposide o 20 μ M di cisplatino per 12 e 24 ore per indurre un danno al DNA. I valori dell'attività luciferasica ottenuti in queste condizioni sono mostrati nella Figura 6 A. I risultati dimostrano che nelle cellule HCT116+/+ si ha una diminuzione significativa dell'induzione Nrf2 -dipendente dopo trattamento con etoposide o cisplatino. Al contrario, tale effetto non si osserva nella linea isogena HCT116 -/-. L'analisi mediante Western blot mostra attivazione di p53 e fosforilazione di ATM nelle cellule HCT116 +/+ trattate sia con etoposide che con il cisplatino.

Infine, abbiamo verificato se i livelli di mRNA di x-CT endogeno indotto in maniera Nrf2-dipendente sono repressi da p53 attivato da danno al DNA. A tale scopo, abbiamo trattato le cellule HCT116 +/+ con cisplatino per 24 ore per indurre danno al DNA e successivamente le abbiamo esposte al DEM per indurre la risposta antiossidante Nrf2-dipendente (Figura 6 B). L'analisi per PCR Real Time dell' mRNA del gene x-CT ha dimostrato che i livelli di mRNA vengono indotti dal DEM, come atteso, e che tale aumento è inibito dal pre-trattamento delle cellule con cisplatino. L' esperimento è stato condotto in parallelo con trasfezione transiente di x-CT/Luc per analizzare anche l'attività luciferasica nelle condizioni suddette (Figura 6 B pannello di sinistra). L'attivazione di p53 e di Nrf2 è stata valutata mediante esperimenti di Western blot (Figura 6 D e E). Lo stesso esperimento effettuato nelle cellule HCT116 -/- mostra che il cisplatino, in assenza di p53, non ha alcun effetto sull'induzione Nrf2-dipendente del gene x-CT.

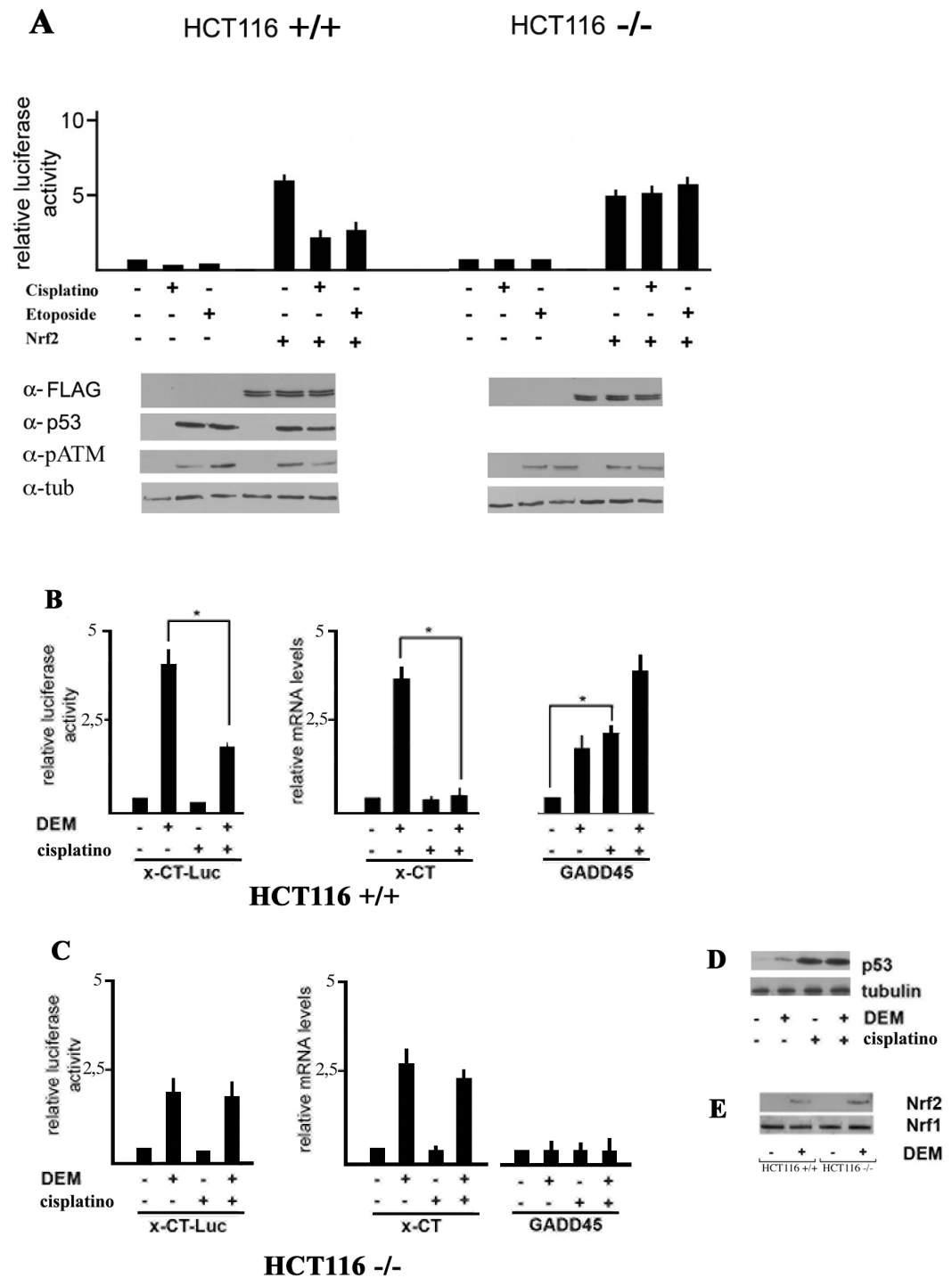


Figura 6

Pannello A. Le cellule HCT116 +/+ e HCT116 -/-, sono state trasfettate con il costrutto x-CT/Luc in assenza e in presenza del vettore di espressione per FLAG-Nrf2. Dopo 24 ore dalla trasfezione le cellule sono state trattate con cisplatino (20 μ M) ed etoposide (200 μ M) per 24 ore ed è stata misurata l'attività luciferasica. In basso sono riportati Western blot di controllo dei

livelli di espressione di FLAG-Nrf2, i livelli di pATM e di p53 nelle cellule HCT116 +/+ dopo danno al DNA.

Pannello B e C. Le cellule HCT116 +/+ e HCT116 -/- sono state trasfettate con x-CT/Luc. Dopo la trasfezione le cellule sono state trattate dapprima con cisplatino (20 μ M per 12 ore) e poi con 500 μ M di DEM per 3 ore. A 48 ore dalla trasfezione le cellule sono state raccolte per misurare l'attività luciferasica, e per misurare i livelli relativi di mRNA di x-CT e GADD45

Pannello C. Analisi nelle cellule HCT116 +/+, mediante Western blot, dei livelli della proteina p53 dopo trattamento con etorposide e/o con DEM

Pannello D Analisi nelle cellule HCT116 +/+ e HCT116 -/-, mediante Western blot, dei livelli nucleari delle proteine Nrf1 e Nrf2 dopo trattamento con 500 μ M di DEM

3.4 p53 sopprime la transattivazione dei geni Nrf2 dipendenti attraverso interazione con il promotore del gene x-CT.

I meccanismi di regolazione p53-dipendenti dei geni antiossidanti potrebbero essere dovuti ad una interazione diretta di p53 con i promotori contenenti sequenze ARE. Per investigare tale possibilità, abbiamo verificato se p53 è presente nel complesso cromatinico del promotore endogeno del gene x-CT. A tale scopo abbiamo trasfettato, con il metodo della lipofectamina, cellule Calu-6 con il vettore CMVp53, FLAG-Nrf2 e con entrambi. Dopo 48 ore le cellule sono state raccolte e processate per esperimenti di immunoprecipitazione della cromatina (ChIP). La Figura 7 A mostra che, in cellule trasfettate con il vettore FLAG-Nrf2, la regione cromatinica contenente il promotore di x-CT viene immunoprecipitata da un anticorpo anti-FLAG, indicando, come atteso, la presenza di Nrf2 a livello del complesso trascrizionale del gene x-CT. Questa stessa regione cromatinica è immunoprecipitata anche da un anticorpo anti-p53 in cellule trasfettate con p53, indicando che p53 è presente nel complesso cromatinico del promotore del gene x-CT. Quando le cellule sono cotrasfettate con entrambi i fattori p53 ed Nrf2, p53 risulta presente nella regione cromatinica del gene x-CT, mentre il legame di Nrf2 alla stessa regione cromatinica risulta notevolmente ridotto. Questi risultati dimostrano che p53 è coinvolto direttamente nella regolazione dell'espressione del gene x-CT in quanto esso è presente nel complesso cromatinico di questo gene. Inoltre, la presenza di p53 nella stessa regione cromatinica riduce fortemente il legame di Nrf2, suggerendo un meccanismo di spiazzamento di Nrf2 da parte di p53.

Per identificare la regione del promotore di x-CT coinvolta nell'interazione con p53, abbiamo generato mutanti di delezione di tale promotore: -143 +15; -

114 +15; -48 +15; Δ -48 -31; Δ -33 -19; Δ -48 -19 clonati a monte della luciferasi. Tali mutanti sono stati cotrasfettati nelle cellule Calu-6 con p53 e sono stati effettuati esperimenti di ChIP utilizzando per l'amplificazione oligonucleotidi specifici per il gene della luciferasi. I risultati di tali esperimenti sono mostrati in Figura 7 B: i mutanti che mancano delle regioni ARE e/o del sito di AP1, sono ancora capaci di legare p53, mentre i due mutanti Δ -33 -19 e Δ -48 -19 privi della regione a monte del sito inizio della trascrizione, contenente anche la TATA box, non sono in grado di legare p53. Per studiare il legame delle proteine endogene Nrf2 e p53 al promotore di x-CT, abbiamo effettuato esperimenti di immunoprecipitazione della cromatina in cellule Hepa sottoposte ad uno stress moderato con 100 μ M DEM. Come si può osservare nella Figura 7 C, in condizioni basali, p53 è presente nel complesso cromatinico del promotore di x-CT. In cellule trattate con 100 μ M DEM, si osserva, come atteso, un aumento del legame di Nrf2 al promotore di x-CT ed una riduzione, seppure minima, del legame di p53 alla medesima regione, indicando che le condizioni di stress possono indurre la cellula a “decidere” se rispondere con un sistema antiossidante Nrf2-dipendente o pro-ossidante p53-dipendente, quando p53 è attivato.

3.5 Mutazioni di p53 nella regione C-terminale non riducono l'effetto inibitorio di p53 sul promotore del gene x-CT

Poiché, come dimostrato negli esperimenti precedenti, p53 risulta associato al complesso cromatinico del promotore del gene x-CT in assenza e in presenza di stress, abbiamo deciso di verificare se modificazioni post-traduzionali di p53 “smascherano” l' effetto inibitorio sui promotori ARE-dipendenti. Quindi

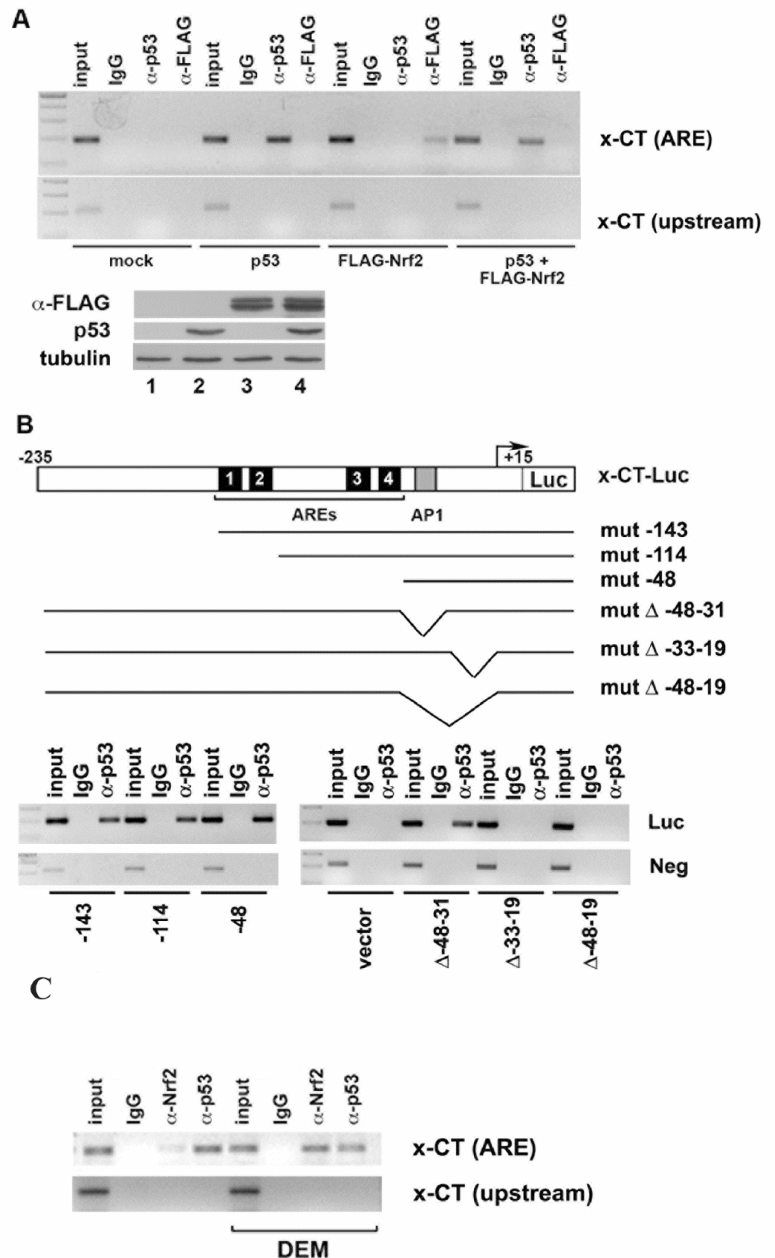


Figura 7. p53 interagisce con il promotore del gene x-CT.

Pannello A. La cromatina, preparata da cellule Calu-6 trasfettate col vettore vuoto, FLAG-Nrf2, CMV-p53 o con entrambi è stata immunoprecipitata con anticorpi diretti contro le immunoglobuline IgG di topo, l'epitopo FLAG e p53 come indicato. La PCR è stata effettuata con coppie di oligonucleotidi per due regioni del gene umano di x-CT, una corrispondente alla regione del promotore -184/+9 contenente gli ARE e l'altra corrispondente alla regione a monte -2002/-1803.

Pannello B. Cellule Calu-6 sono state trasfettate con p53 e con mutanti di delezione del promotore del gene x-CT. La costruzione di tali mutanti è stata descritta nei “Materiali e Metodi”. In figura è mostrata la rappresentazione schematica dei mutanti; il mutante -114 manca dei primi due ARE, mentre il mutante -48 manca di tutti e quattro gli ARE. Nel mutante Δ -48 -31 l’elemento in cis di AP-1 è stato rimosso; nel mutante Δ -33 -19 la regione a monte del sito d’inizio della trascrizione, che contiene anche la TATA box, è stata deleta; il mutante Δ -48 -19 manca sia del sito AP-1 sia della TATA box. La PCR sul DNA immunoprecipitato è stata effettuata con due coppie di oligonucleotidi che amplificano due regioni del gene della luciferasi: una subito a valle del promotore del gene x-CT, dopo il sito inizio della trascrizione della luciferasi (+61/ +257) (Luc) e l’altra usata come controllo negativo, molto distante dal sito inizio della trascrizione (+1766/+1986) (Neg).

Pannello C. La cromatina è stata preparata da cellule Hepa 1-6 trattate o non con DEM 100 μ M ed è stata immunoprecipitata con anticorpi diretti contro le immunoglobuline IgG di topo, Nrf2 e p53. La PCR è stata effettuata con oligonucleotidi disegnati sulla base del gene murino di x-CT (-194/+15). Il controllo dell’amplificazione è stato effettuato con oligonucleotidi che amplificano una regione a monte del gene murino di x-CT (-2157/-1956) (x-CT(upstream)). Gli esperimenti di “Chromatin immunoprecipitation” sono stati effettuati come descritto nei Materiali e Metodi.

abbiamo effettuato esperimenti di trasfezione con una serie di mutanti di p53 nella regione C-terminale, che portano una sostituzione amminoacidica di una serina o di una lisina dove sono state descritte modificazioni post-traduzionali (rispettivamente fosforilazioni e acetilazioni). Essi sono: S378A, K382R, S315A, S376A, K320R, S392A, K382Q, K320Q forniti dal prof. E. Appella (National Institutes of Health, Bethesda, Md, USA). Tali mutanti sono stati trasfettati insieme al costrutto x-CT/Luc da soli e con Nrf2 ed è stata misurata l'attività della luciferasi. I risultati dimostrano che nessuna delle suddette mutazioni influenza l'attività di p53: infatti non si osserva una significativa differenza dell'attività luciferasica tra il p53 "wild type" e i mutanti. Tali mutanti sono stati anche trasfettati in cellule Calu-6 insieme a Nrf2, per esperimenti di ChIP. Ciascuno dei mutanti, al pari della proteina p53 "wild type", è in grado di associarsi al promotore del gene x-CT impedendo ad Nrf2 di legare le sequenze ARE. Abbiamo anche studiato, mediante PCR real-time, la regolazione dei geni endogeni x-CT ed NQO1 ipereprimendo ciascun mutante con e senza Nrf2 ed i risultati dimostrano che tutti i mutanti si comportano in modo simile alla proteina p53 "wild type" (dati non mostrati).

3.6 Il gene NQO1 è regolato da p53 in modo simile al gene x-CT

I risultati con i mutanti di delezione del promotore di x-CT avevano evidenziato che l'effetto inibitorio di p53 veniva rimosso solo eliminando una regione prossimale al sito inizio trascrizione contenente la TATA box. Abbiamo quindi deciso di studiare anche il promotore del gene NQO1 costruendo mutanti di delezione del promotore (-754, -600 e -480) considerato che il costrutto da noi precedentemente analizzato conteneva circa 1000 bp

monte del sito inizio della trascrizione (Figura 8 A). Questi mutanti sono stati trasfettati in cellule Calu-6 in assenza ed in presenza di vettori che esprimono p53, Nrf2 ed entrambi. Come mostrato in Figura 8 A, questi costrutti, che includono l'elemento ARE, sono attivati da Nrf2 e mantengono l'effetto inibitorio di p53.

Per verificare la presenza di p53 sul promotore endogeno di NQO1 abbiamo trasfettato cellule Calu-6 con CMVp53, FLAG-Nrf2 e con entrambi i costrutti e abbiamo effettuato esperimenti di ChIP. Tali esperimenti hanno dimostrato che p53 è presente nella regione -480 del promotore di NQO1 e la sua iperespressione impedisce ad Nrf2 di legarsi (Figura 8 B).

E' possibile quindi ipotizzare un meccanismo comune di regolazione dei promotori ARE-dipendenti da parte di p53. Restano tuttavia da chiarire i meccanismi molecolari con cui p53 esplica tale regolazione trascrizionale.

3.7 L'assenza di p53 riduce la sensibilità delle cellule all'apoptosi indotta dal DEM.

Gli esperimenti descritti mostrano che p53 presenta, nelle nostre condizioni sperimentali, un effetto antagonista rispetto ad Nrf2 sui promotori dei geni ARE-dipendenti. L'osservazione che la risposta antiossidante mediata da Nrf2 viene inibita da p53, suggerisce che, in assenza di p53, la sensibilità delle cellule all'apoptosi indotta dai ROS dovrebbe essere alterata. Per esaminare tale possibilità, abbiamo misurato l'apoptosi indotta da concentrazioni crescenti di DEM in cellule HCT116 p53+/+ e HCT116 p53-/- . Come mostrato in Figura 9, l'assenza di p53 riduce fortemente la sensibilità di tali cellule all'apoptosi indotta dallo stress ossidativo DEM-dipendente.

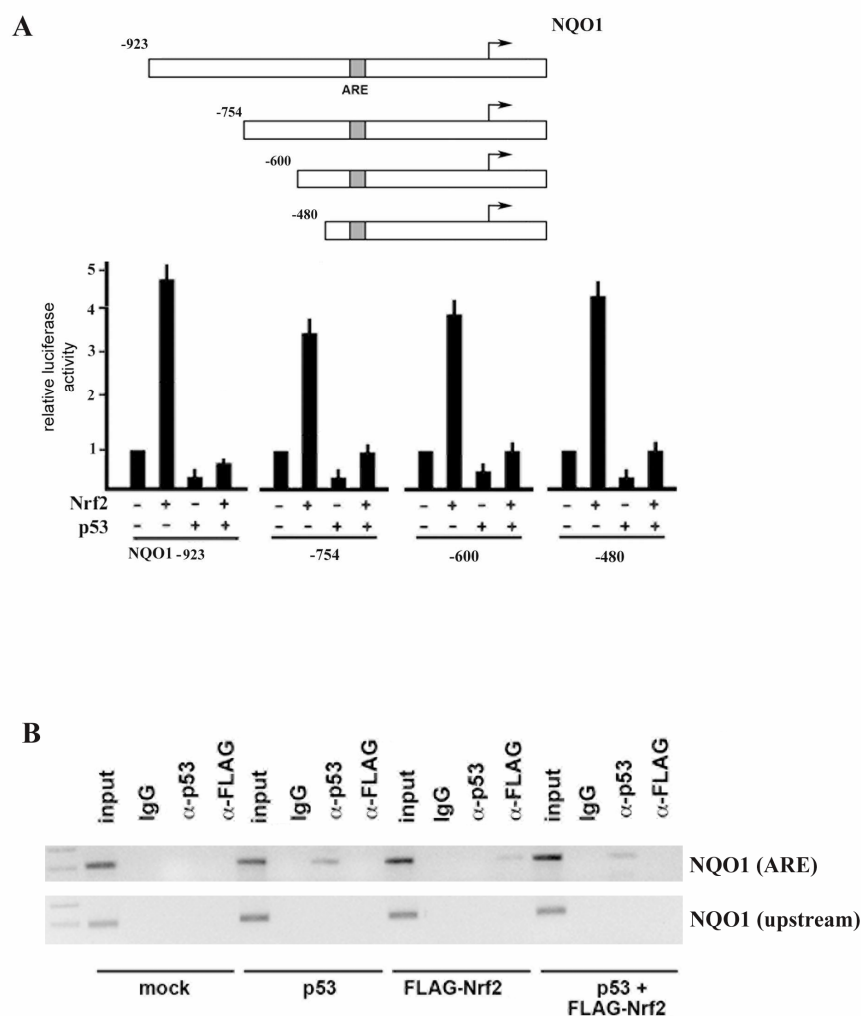


Figura 8. Effetto di p53 sulla regolazione del promotore Nrf2- dipendente del gene NQO1

Pannello A. La regione del promotore di NQO1 -923+111 ottenuta per PCR usando come stampo il DNA genomico delle cellule HEK293 e clonata a monte del gene della luciferasi è stata usata come stampo per clonare i mutanti di delezione.. Tali costrutti sono stati trasfettati nella cellule Calu-6. Dopo 36 ore dalla trasfezione, le cellule sono state raccolte ed è stata misurata l'attività luciferasica

Pannello B. La cromatina, preparata da cellule Calu-6 trasfettate col vettore vuoto, FLAG-Nrf2, CMV-p53 o con entrambi è stata immunoprecipitata con anticorpi diretti contro le immunoglobuline IgG di topo, FLAG e p53 come indicato. La PCR è stata effettuata con coppie di oligonucleotidi per due regioni del gene umano di NQO1, una corrispondente alla regione del promotore -450-250 contenente l'unico elemento ARE e l'altra corrispondente alla regione a monte -2295-2015.

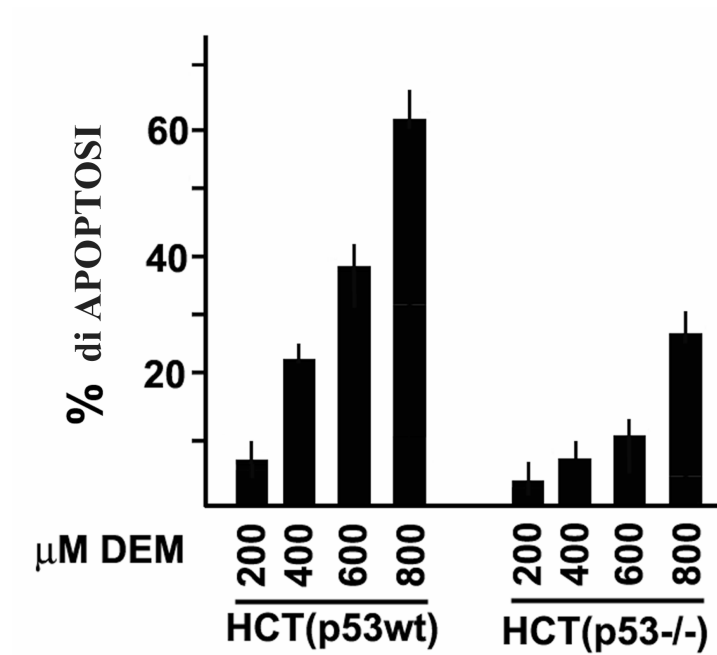


Figura 9. Apoptosi indotta dal trattamento con DEM in cellule HCT116
Cellule HCT116 (p53WT) e HCT116 (p53-/-) sono state trattate con varie concentrazioni di DEM come indicato per 24 ore. La percentuale di cellule apoptotiche è stata misurata attraverso FACS come descritto nei Materiali e Metodi.

4. DISCUSSIONE E PROSPETTIVE FUTURE

Alcuni fattori trascrizionali tra cui Nrf2 e p53 sembrano avere un ruolo determinante nella comparsa del fenotipo resistente allo stress ossidativo. La cellula risponde all'accumulo dei ROS attivando da un lato la risposta antiossidante Nrf2-dipendente e dall'altro un blocco transitorio del ciclo cellulare per permettere il riparo del DNA controllato da p53. Se il danno dovuto allo stress non è riparabile, p53 induce apoptosi.

I dati presentati in questa tesi dimostrano che questi due meccanismi di regolazione sono integrati e comunicanti tra loro.

Esperimenti effettuati nel nostro laboratorio hanno dimostrato che cloni resistenti allo stress ossidativo indotto dalla deplezione del glutathione presentano iperespressione di geni Nrf2-dipendenti (x-CT, NQO1 e Gst α 1) dovuta ad accumulo nucleare di Nrf2. Poiché un danno al DNA indotto dallo stress ossidativo può attivare p53, abbiamo analizzato la risposta di tali geni in condizioni di iperespressione o attivazione di p53 ed i risultati dimostrano che p53 reprime la trascrizione dei geni x-CT NQO1 e Gst α 1.

Il coinvolgimento di p53 nella regolazione dell'omeostasi redox cellulare è stato suggerito da numerosi studi che hanno dimostrato che p53 può avere sia funzioni pro-ossidanti che antiossidanti. I meccanismi di repressione mediati da p53 possono dipendere da un legame diretto di p53 con il DNA, da interazione con altre proteine, con i fattori basali della trascrizione, con proteine che modificano la cromatina, nonché dal legame di p53 a elementi di sequenza che differiscono notevolmente dalla sequenza di attivazione canonica.

Esperimenti di ChIP riportati in questa tesi dimostrano che p53 si trova nel complesso cromatinico dei promotori dei geni x-CT ed NQO1 ed è in grado di

inibire il legame di Nrf2 su entrambi i promotori (indicando un meccanismo molecolare comune ai geni Nrf2 -dipendenti), anche se in condizioni di uno stress moderato sembra prevalere l'attività di Nrf2 su quella di p53. Inoltre, la dissezione del promotore del gene x-CT ci ha permesso di definire la regione di interazione di p53 come quella prossimale al sito inizio della trascrizione.

Allo scopo di comprendere le “cascate” di segnale alla base dell'effetto inibitorio di p53, abbiamo utilizzato mutanti di p53 in specifici siti di serine o lisine della regione C-terminale, bersaglio rispettivamente di fosforilazioni e acetilazioni. I risultati dimostrano che nessuno dei siti analizzati è implicato nella funzione pro-ossidante di p53, tuttavia ci proponiamo di analizzare anche alcuni siti della regione N-terminale modificati da fosforilazioni e acetilazioni, nonché lisine della regione C-terminale modificate da metilazioni.

I risultati riportati in questa tesi dimostrano una rete di comunicazione tra i sistemi di regolazione anti-ossidanti e quelli pro-ossidanti. Nell'ambito di un sistema cellulare danneggiato, p53 attivo blocca l'induzione dei geni Nrf2-dipendenti che con il loro ruolo antiossidante potrebbero prevenire l'induzione dell'apoptosi, che richiede invece un accumulo di ROS. L'assenza infatti di p53, determina una minore sensibilità delle cellule all'apoptosi indotta da ROS. In questo modo, p53 opera un controllo su Nrf2 e previene le possibili conseguenze di una attività persistente della risposta antiossidante. E' possibile ipotizzare quindi che p53 ed Nrf2 lavorino in maniera integrata e che, a seconda delle condizioni cellulari, venga favorita ora l'attività antiossidante di Nrf2 (in condizioni di stress moderato), ora quella di p53 (in condizioni di uno stress maggiore).

5 BIBLIOGRAFIA

- 1 Halliwell B, and Whiteman M. (2004) Br J Pharmacol. **42** 231-55.
- 2 Dawson, V. L. and Dawson, T. M. (1996) Cell Death Differ **3** 71-78
- 3 M. Valko, et al. (2006) Chemico-Biological Interactions **160** 1–40
- 4 Finkel T. and Holbrook N.J. (2000) Nature **408** 239-47
- 5 Halliwell B. (2006) J Neurochem. **97** 1634-58..
- 6 Finkel T. (2005) Nat Rev Mol Cell Biol. **6** 971-6
- 7 Droge W. (2002) Physiol Rev **82** 47-95
- 8 Finkel T. (2003) Curr Opin Cell Biol. **15** 247-54
- 9 Esposito F., et al. (2004) Neurochem Res. **29** 617-28
- 10 Kolch W. (2000) J. Biol. Chem **351** 389-305
- 11 Meng TC, et al. (2002) Mol Cell. **9** 387-99.
- 12 Blanchetot C, et al. (2002) EMBO J. **21** 493-503
- 13 Cimino, F., et al. (1997) Curr. Top. Cell. Regul. **35**: 123-148.
- 14 Kobayashi M, and Yamamoto M 2005 Antioxid Redox Signal **7** 385-94
- 15 Itoh K, et al. (1999) Genes Dev **13**: 76-86.
- 16 Dinkova-Kostova AT, et al. 2002 Proc Natl Acad Sci USA **99** 11908-13
- 17 Hollstein, M., et al. (1991) Science **253**: 49-53
- 18 Green DR. (2000) Cell. 102 1-4
- 19 Danial NN, and Korsmeyer SJ. (2004) Cell. 116 205-19
- 20 Chipuk JE, et al. (2004) Science. Feb **303** 1010-4
- 21 Moll UM, et al. (2005) Curr Opin Cell Biol. **17** 631-6
- 22 Harman, D. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **78** 7124-7128
- 23 Stadtman, E.R. (1992) Science. **257** 1220-1224

- 24 Beckman, K.B., and Ames, B.N. (1998) *Physiol Rev.* **178** 547-581
- 25 Longo, V.D., and Finch C. E. (2003) *Science* **299** 1342-1346.
- 26 Faraonio R, et al. (2002) *Cell Death Differ.* **9** 862-4
- 27 Matheu A, et al. (2007) *Nature* **448** (7151):375-9.)
- 28 Ko LJ, and Prives C. (1996) *Genes Dev.* **10** 1054-72.
- 29 Lee AC, et al. (1999) *J Biol Chem.* **274** 7936-40.
- 30 Campisi J. (2005) *Cell.* **120** 513-22
- 31 Storz P. (2005) *Front Biosci.* **10** 1881-96.
- 32 Szatrowski TP, and Nathan CF. (1991) *Cancer Res.* **51** 794-8
- 33 Johnstone RW, et al. (2002) *Cell. Jan* **108** 153-64
- 34 Hekimi S, and Guarente L. (2003) *Science.* **299** 1351-4.
- 35 Balaban RS et al. (2005) *Cell.* **120** 483-95.
- 36 Murphy CT, et al. (2003) *Nature.* **424** 277-83.
- 37 Longo VD, and Fabrizio P. (2002) *Cell Mol Life Sci.* **59** 903-8.
- 38 Migliaccio, E., et al. (1999) *Nature* **402** 309-313
- 39 North BJ, and Verdin E.(2004) *Genome Biol.* **5** 224
- 40 Mostoslavsky R, et al. (2006) *Cell.* **124** 315-29
- 41 Itoh K, et al. (1995) *Mol Cell Biol.* **15** 4184-93
- 42 Pervaiz S, and Clement MV. (2004) *Curr Pharm Des.* **10** 1969-77
- 43 Sekhar K. R., et al. 2000 *Biochem Biophys Res Commun* **270** 311-317.
- 44 Motohashi H, et al. (2004) *Proc Natl Acad Sci U S A.* **101** 6379-84
- 45 Kobayashi A., et al. (2006) *Mol and Cel Biol* **26.** 221-229
- 46 Moll UM, et al. (2005) *Curr Opin Cell Biol.* **17** 631-6.
- 47 Hayashi A, et al. (2003) *Biochem Biophys Res Commun.* **310** 824-9.
- 48 Clement MV, and Stamenkovic I. (1996) *EMBO J.* **15** 216-25.

- 49 Levine, A. J. (1997) *Cell* **88**:323-331.
- 50 Vogelstein B, et al. (2000) *Nature*. **408** 307-10.
- 51 Wahl GM, and Carr AM. (2001) *Nat Cell Biol*. **3** E277-86.
- 52 Zhao R, et al. (2000) *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol*. **65** 475-482
- 53 Chehab, N. et al. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. **96**, 13777–82
- 54 Shieh et al. C. (1997) *Cell* **91**, 325–334
- 55 Dumaz, N et al. (1999) *EMBO J*. **18**, 7002–7010.
- 56 Saito, S. et al. (2002) *J. Biol. Chem*. **277**, 12491–12494
- 57 Banin S, et al. (1998) *Science*. **281** 1674-7.
- 58 Abraham J, et al. (2000) *J Mol Biol*. **295** 853-64
- 59 Sakaguchi, K et al.. (1997) *Biochemistry* **36**, 10117–10124
- 60 Wang, Y., and Prives, C. (1995) *Nature* **376**, 88–91
- 61 : Li, M. et al. (2002) *J. Biol. Chem*. **277**, 50607–50611
- 62 Braithwaite AW, et al. (2006) *Cell Death Differ*. **13** 984-93.
- 63 Johnson TM, and Attardi LD. (2006) *Cell Death Differ*. **13** 902-8.
- 64 Harper JW, et al. (1993) *Cell*. **75** 805-16.
- 65 Kastan MB, et al. (1992) *Cell*. **71** 587-97.
- 66 Mackintosh C.(2004) *Biochem J*. **381** 329-42.
- 67 Chipuk JE, and Green DR.(2006) *Cell Death Differ*. **13** 994-1002..
- 68 Polyak K, et al. (1997) *Nature*. **389** 300-5
- 69 Sablina AA, et al. (2005) *Nat Med*. **11** 1306-13.
- 70 Tan M, et al. (1999) *J Biol Chem*. **274** 12061-6
- 71 Gatz SA, and Wiesmuller L. (2006) *Cell Death Differ*. **13** 1003-16
- 72 Polyak K, et al. (1997) *Nature*. **389** 300-5
- 73 el-Deiry WS, et al. (1992) *Nat Genet*. **1** 45-9.

- 74 Harms KL, and Chen X. (2006) Cell Death Differ. **13** 890-7
- 75 Hill DA, et al. (2004) J Cell Biochem. **91** 987-98.
- 76 An W, et al. (2004) Cell. **117** 735-48.
- 77 Burns TF, and El-Deiry WS. (2003) Cancer Biol Ther. **2** 431-43.
- 78 Ho J, and Benchimol S. (2003) Cell Death Differ. **10** 404-8.
- 79 Laptenko O, and Prives C. (2006) Cell Death Differ. **13** 951-61.
- 80 Liu G, et al. (1999) Biochem Biophys Res Commun. **264** 359-64.
- 81 Lee KC, et al. (1999) Mol Cell Biol. **19** 1279-88
- 82 St Clair S, et al. (2004) Mol Cell. **16** 725-36.
- 83 Subbaramaiah K, et al. (1999) J Biol Chem. **274** 10911-5
- 84 Murphy M, et al. (1999) Genes Dev. **13** 2490-501.
- 85 Chun AC, and Jin DY. (2003) J Biol Chem. **278** 37439-50.
- 86 Wilkinson DS, et al. (2005) Mol Cell Biol. **25** 1200-12
- 87 Johnson RA, et al. (2005) J Biol Chem. **280** 13213-9.
- 88 Kim E, et al. (2003) Oncogene. **22** 7716-27.
- 89 Gridasova AA, and Henry RW. (2005) Mol Cell Biol. **25** 3247-60..
- 90 Johnson RA, et al. (2001) J Biol Chem. **276** 27716-20.
- 91 Zhai W, and Comai L. (2000) Mol Cell Biol. **20** 5930-8
- 92 Crichton D, et al. (2003) EMBO J. **22** 2810-20.
- 93 Eichhorn K, and Jackson SP. (2001) J Biol Chem. **276** 21158-65.
- 94 Cairns CA, and White RJ.(1998) EMBO J. **17** 3112-23.
- 95 Livak KJ, and Schmittgen TD. (2001) Methods. **25** 402-8.
- 96 Faraonio R., et al. (2006) Antioxid Redox Signal. **8**, 365-374.
- 97 Adler V, et al. (1999) EMBO J. **18** 1321-34